

**Bestimmung konformationeller und struktureller
Eigenschaften mit NMR-Spektroskopie:
Synthese von Dolastatin 10-Derivaten,
Hammerhead Ribozym und Phospholamban**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Stefanie Lamberth

aus Viernheim

Frankfurt am Main 2000

(DF1)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 1996 bis September 2000 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Griesinger am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. C. Griesinger danke ich für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten, die Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen während meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Dr. C. Griesinger danke ich für die gute und freundschaftliche Atmosphäre während meiner Dissertation. Aus dem Kreis der vielen Kollegen, die mich während meiner Doktorarbeit durch zahlreiche Diskussionen und hilfreichen Tips unterstützt haben, möchte ich nur einen kleinen Teil nennen. Bei Herrn Dr. Marcus Maurer, Herrn Wolfgang Peti und Herrn Dirk Bockelmann möchte ich mich für die stete Hilfe am Spektrometer bedanken. Bei synthetischen Fragestellungen waren die Informationen von Herrn Christian von der Heyden und Priv.-Doz. Dr. Stephen Hashmi sehr hilfreich.

Für die Zusammenarbeit beim Dolastatin/Tubulin-Projekt danke ich Herrn Dirk Bockelmann, Herrn Dr. Andreas Kamlowksi, Herrn Dr. Michael Boretzki und Herrn Dr. Christian Richter für die Hilfe am Spektrometer und der Präparation der ersten Tubulin-Proben. Außerdem möchte ich Herrn Dr. Peter Eschenbrenner und Herrn Dr. Dierk Blechschmidt für ihre Hilfe bei biochemischen Fragestellungen danken.

Für die Zusammenarbeit beim Hammerhead Ribozym-Projekt möchte ich Herrn Prof. Dr. Fritz Eckstein vom Max Planck Institut für experimentelle Medizin in Göttingen für die Synthese der Oligonucleotide danken. Herrn Prof. Dr. Harald Schwalbe möchte ich für die stete Diskussionsbereitschaft im Rahmen des Projektes danken.

Für die Zusammenarbeit beim Phospholamban-Projekt möchte ich Herrn Dr. Holger Schmitt und Herrn Dr. Joachim Krebs aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Ernesto Carafoli an der ETH Zürich für die Überlassung der NMR-Probe danken.

Ellen Lichte und Elke Stirnal danke ich herzlich für die schnelle Durchführung der zahlreichen, nicht immer leicht durchzuführenden HPLC-Trennungen.

Ich danke Frau Bettina Elshorst, Herrn Dirk Bockelmann und Herrn Christian von der Heyden für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zuletzt gilt mein Dank auch meiner Familie, die mich im Verlauf des Studiums in jeder Hinsicht unterstützt hat. Herzlichst möchte ich mich bei meinem Freund Dirk für seine Geduld und stete Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und verwendete englische Begriffe	V
1 Einleitung	1
2 Bindungsstudien des aktiven Konformers von Dolastatin 10 in Gegenwart von Tubulin	5
2.1 Einführung	5
2.1.1 Dolastatine	5
2.1.2 Colchicin	7
2.1.3 Tubulin und Mikrotubuli	8
2.1.4 Zellzyklus	12
2.1.5 Bindung von Dolastatin 10 und Colchicin an Tubulin	14
2.1.6 Taxol und Epothilone	17
2.1.7 Bindungsstellen von antimittotischen Wirkstoffen an Tubulin	18
2.1.8 Cytotoxizität von Dolastatin 10	19
2.1.9 Konformationsanalyse von Dolastatin 10	20
2.1.10 Kinetik der Bindung von Dolastatin 10 an Tubulin	20
2.1.11 Aufgabenstellung	21
2.2 Durchführung	22
2.2.1 Syntheseplanung der zyklischen Dolastatin 10-Derivate	22
2.2.2 Synthese der zyklischen Dolastatin 10-Derivate Teil 1	23
2.2.3 NMR-spektroskopische Untersuchung der zyklischen Peptide Teil 1	27
2.2.4 Synthese der zyklischen Dolastatin 10-Derivate Teil 2	30
2.2.5 NMR-spektroskopische Untersuchung der zyklischen Peptide Teil 2	39
2.2.6 Synthese des linearen Dolastatin 10-Derivates	43
2.2.7 Synthese von ¹³ C-teilmarkiertem Colchicin	44
2.2.8 Isolierung von Tubulin aus Schweinehirn	47
2.2.9 Polymerisationsstudien von Tubulin in Gegenwart von Inhibitoren	51
2.2.10 Bestimmung der Kinetik der cis-trans-Isomerisierung von 41	58
2.2.11 NMR-spektroskopische Untersuchungen des ¹⁵ N-markierten Dolastatin 10-Derivates in Gegenwart von Tubulin	61
2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	79

3	NMR-spektroskopische Untersuchungen zum Übergangszustand des Hammerhead Ribozyms	81
3.1	Das Hammerhead Ribozym	81
3.2	Vanadate	83
3.2.1	Biochemische Aspekte von Vanadat	84
3.2.2	Vanadat und NMR-Spektroskopie	85
3.3	NMR-Studien von Vanadat-Komplexen mit Nucleosiden und Nucleotiden	86
3.4	NMR-Studien von Vanadat-Komplexen mit ternären RNA-Konstrukten	91
4	NMR-spektroskopische Untersuchung der Struktur von Phospholamban	97
4.1	Einleitung	97
4.2	NMR-spektroskopische Untersuchung von Phospholamban	100
4.2.1	NMR-Spektroskopie	100
4.2.2	Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebung	101
4.2.3	Strukturrechnung	107
4.2.4	Die Struktur von Phospholamban	108
5	Zusammenfassung	121
6	Experimenteller Teil	125
6.1	Synthese von Dolastatin 10-Derivaten und ^{13}C-markiertem Colchicin	125
6.1.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen	125
6.1.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	127
6.1.3	Synthese der zyklischen Dolastatin 10-Derivate	128
6.1.4	Synthese des linearen Dolastatin 10-Derivates 41	180
6.1.5	Synthese von ^{13}C -markiertem Colchicin	186
6.2	Isolierung von Tubulin aus Schweinehirn	192
6.2.1	SDS-Polyacrylamidgele	194
6.2.2	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	194
6.2.3	DEAE-Sephadex A50-Säule	195
6.3	Polymerisationsstudien von Tubulin in Gegenwart von Inhibitoren	195
7	Präparation, Aufnahme- und Prozessierungs-Parameter der untersuchten Proben	197
7.1	Zyklische Dolastatin 10-Derivate	197
7.1.1	NMR-Spektroskopie und Zuordnung von 16a	197
7.1.2	NMR-Spektroskopie und Zuordnung von 16b	201

7.1.3	NMR-Spektroskopie und Zuordnung von 16c	204
7.1.4	NMR-Spektroskopie und Zuordnung von 35a	205
7.1.5	NOE- <i>restraints</i> für die Strukturrechnung von 35a	207
7.1.6	NMR-Spektroskopie und Zuordnung von 35b	209
7.1.7	NOE- <i>restraints</i> für die Strukturrechnung von 35b	210
7.2	Kinetische Messungen der cis-trans-Isomerisierung von 41	212
7.3	Formel zur Bestimmung der Kinetik der cis-trans-Isomerisierung von 41	212
7.4	NMR-spektroskopische Bindungsstudien von ¹³C-markiertem Colchicin und ¹⁵N-markiertem Dolastatin 10-Derivat in Gegenwart von Tubulin	214
7.5	Hammerhead Ribozym	217
7.5.1	Vanadat-Komplexe mit Nucleosiden und Nucleotiden	217
7.5.2	Vanadat-Komplexe mit ternären RNA-Konstrukten	218
7.6	Phospholamban	220
7.6.1	NMR-Spektroskopie	220
7.6.2	NOE- <i>restraints</i>	221
7.6.3	Dihedralwinkel- <i>restraints</i>	231
7.6.4	Protokolle der Strukturberechnung von Phospholamban	232
7.7	Publikation	236
8	Literaturverzeichnis	237

Abkürzungen und verwendete englische Begriffe

Die verwendeten Ein- und Dreibuchstabenabkürzungen für Aminosäuren entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommision für biochemische Nomenklatur (*J. Biochem.* (1984) **138**, 9; *J. Biol. Chem.* (1972) **247**, 977; *Biochemistry* (1970) **9**, 3471).

A	Ala	L-Alanin
C	Cys	L-Cystein
D	Asp	L-Asparaginsäure
E	Glu	L-Glutaminsäure
F	Phe	L-Phenylalanin
G	Gly	L-Glycin
H	His	L-Histidin
I	Ile	L-Isoleucin
K	Lys	L-Lysin
L	Leu	L-Leucin
M	Met	L-Methionin
N	Asn	L-Asparagin
P	Pro	L-Prolin
Q	Gln	L-Glutaminsäure
R	Arg	L-Arginin
S	Ser	L-Serin
T	Thr	L-Threonin
V	Val	L-Valin
W	Trp	L-Tryptophan
Y	Tyr	L-Tyrosin

Å	Ångstrom
Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
ADP	Adenosindiphosphat
Ar.	aromatisch
assignment	Zuordnung (der Resonanzen im NMR-Spektrum)
ATP	Adenosintriphosphat
B ₀	Stärke des Magnetfeldes
backbone	Rückgrat des Proteins
ber.	berechnet
Boc	tert.-Butoxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
bzl.	benzylisch
CD	Circular Dichroismus

CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
C ₁₂ E ₈	n-Dodecyl-Octaethylenglykol-Monoether
COSY	Correlation Spectroscopy
CSA	chemische Verschiebungsanisotropie
d1	Relaxations-Delay, Wartezeit nach der Akquisition
Dap	Dolaproin
Dav	Dolavain
DIEA	Ethyl-diisopropylamin
Dil	Dolaisoleuin
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynucleinsäuren
Doe	Dolaphenin
Dov	Dolavalin
Dpy	Dolapyrrolidon
DQF	Doppelquantenfilter
E.COSY	exclusive COSY
E-Bindungsstelle	austauschende Bindungsstelle
EE	Essigester
EGTA	Ethylen-Glykol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-Tetra-Acetat
Et al.	und andere
FT	Fourier Transformation
GDP	Guanosindiphosphat
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GTP	Guanosintriphosphat
H	n-Hexan
Hiva	2-Hydroxyvaleriansäure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
H ^N	Amidproton
HOBt	1-Hydroxy-Benzo-Triazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	Inhibitor-Konzentration, bei der die Wirkung des Inhibitors 50% des ungehemmten Wertes beträgt
Im	Imidazol
IR	Infrarotspektroskopie
kDa	Kilo-Dalton
LDA	Lithium-diisopropylamid
LiHMDS	Lithium-hexamethyldisilazid
MAPs	Mikrotubuli assoziierte Proteine
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MeOTf	Methyltrifluormethansulfonsäureester
Mes	2-(N-Morpholino)-Ethan-Sulfonat
Min.	Minuten
MOC	Microtubule Organizing Centre, Mikrotubuli-organisierendes Zentrum

MS	Massenspektrometrie
N-Bindungsstelle	nicht austauschende Bindungsstelle
NCI	National Cancer Institute
$^nJ_{ab}$	skalare Kopplungskonstante über n Bindungen zwischen den Kernen a und b
NMR	Nuclear Magnetic Resonance; Kernresonanzspektroskopie
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NS	Number of Scans, Anzahl der Transienten
P.E.COSY	primitive E.COSY
Ph	Phenyl
P _i	Phosphat
Pipes	1,4-Piperazindiethansulfonat
PPA	Propylphosphonsäureanhydrid
ppm	parts per million
restraint	Nebenbedingung aufgrund experimenteller Daten
R _f	Retentionsfaktor
rmsd	root mean square deviation
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
R ₂	transversale Relaxationsrate
SDS	Sodium Dodecyl-Sulfate, Natriumdodecylsulfat
SI	Size, prozessierte Datenpunkte
Smp.	Schmelzpunkt
SW	Spectral Width, spektrale Breiten
T	Toluol
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetraethyluronium Tetrafluorborat
tBu	tert. Butyl
TBYCLU	(1,1,3,3-Bis(tetramethylen)-chlorouronium) Tetrafluorborat
TD	Time Domain, aufgenommene Datenpunkte
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TPPI	Time Proportional Phase Incrementation
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
TSP	2,2,3,3-Tetradeutero-3-(trimethylsilyl)-propionsäure
WATERGATE	Water suppression by gradient-taylorized excitation, Verfahren zur Wasserunterdrückung
Z	Benzyloxycarbonyl

Griechische Buchstaben

τ_c	Korrelationszeit
τ_m	Mischzeit
ϕ_i, ψ_i	Winkel des Proteinrückgrats der Aminosäure i
ω_i	Resonanzfrequenz des Kernes i
δ	Chemische Verschiebung
γ_i	Gyromagnetische Verhältnis des Kernes i
$\Delta\sigma$	Differenz der axialen und senkrechten Hauptachse des axial symmetrischen chemischen Verschiebungstensor
μ_0	Magnetische Feldkonstante

1 Einleitung

Die NMR-Spektroskopie ist eine wichtige analytische Methode, um Vorgänge von Biomolekülen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Durch die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von Molekülen und ihrem konformationellen Verhalten kann man Aussagen über ihre Funktion herleiten. Der Zusammenhang von Struktur und biologischer Wirkung kann die Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe ermöglichen, welche sich durch eine selektive Wechselwirkung mit dem molekularen Zielmolekül auszeichnen.

Durch die Verbindung von NMR-spektroskopischen Methoden mit der kombinatorischen Synthese, die eine große Vielfalt von unterschiedlichen Substanzen produziert, kann eine systematische Suche nach neuen Liganden für Biomakromoleküle realisiert werden (SAR by NMR) [1]. Dadurch kann man schnell bindende Wechselwirkungen auf atomarer Ebene beobachten und diese Information für das Design von neuen Liganden verwenden.

Durch die Entwicklung von neuen NMR-spektroskopischen Methoden kann man zusätzliche Parameter für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Biomakromolekülen gewinnen. Neben den Abstandsinformationen aus NOE-Daten und den Dihedralwinkeln aus Kopplungskonstanten werden die Relaxationsraten der Kreuzkorrelation zwischen zwei Bindungsvektoren genutzt, um den Torsionswinkel der beiden betrachteten Bindungen zu bestimmen [2]. Dies führt zu einem weiteren Parameter bei der Strukturberechnung von Biomakromolekülen, welcher zur Verfeinerung der dreidimensionalen Struktur führt.

Auch die Molmassengrenze der NMR-Spektroskopie von ca. 50 kDa konnte durch das TROSY-Experiment [3] in die Größenordnung von 110 kDa erweitert werden. Hierbei wird ein Effekt ausgenutzt, welcher in der Wechselwirkung von zwei unterschiedlichen Relaxationsmechanismen begründet ist und bei höheren Feldstärken (600 – 800 MHz) auftritt.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Bestimmung von konformationellen und strukturellen Eigenschaften von Biomolekülen jeglicher Größenordnung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. In Kapitel 2 wird die Bindung eines Konformers des Dolastatin 10, einem antimitotischen Naturstoff, an das Protein Tubulin (ca. 110 kDa) untersucht. Hierbei wird die Synthese von neuartigen Dolastatin 10-Derivaten beschrieben, welche die beiden Hauptkonformationen des Dolastatin 10 in Lösung widerspiegeln, und diese in einem biochemischen Testsystem bezüglich ihres Einflusses auf die Tubulin-Polymerisation untersucht. Die Isolierung des Tubulins aus Schweinehirnen für die *in vitro*-Bindungsstudien und die NMR-Spektroskopie wird vorgestellt. Die Bindung des Liganden in Form eines Dolastatin 10-Derivates am Tubulin wird NMR-spektroskopisch verfolgt. Hierbei findet auch das TROSY-Experiment bzw. der damit verbundene TROSY-Effekt Anwendung.

Die Versuche zum Einsatz von Vanadat als Übergangszustandsanalogon für Phosphat bei der Spaltreaktion des Hammerhead Ribozyms werden in Kapitel 3 beschrieben. Zunächst werden die experimentellen Rahmenbedingungen an einfachen Nucleosiden und Nucleotiden getestet, um dann diese auf verschiedene RNA-Konstrukte des Hammerhead Ribozyms (48 Nucleotide) zu übertragen.

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Membranproteins Phospholamban (6 kDa) in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ ist in Kapitel 4 gezeigt. Hierbei werden die aus homonuclearen zweidimensionalen Spektren gewonnenen Abstandsinformationen aus

NOE-Daten und Dihedralwinkel aus Kopplungskonstanten verwendet, um die Struktur des Phospholambans in Lösung zu gewinnen.

Alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden in Kapitel 5 zusammengefaßt. Eine Zusammenstellung aller durchgeführten Synthesen und die Isolierung des Tubulins finden sich in Kapitel 6. Die experimentellen Parameter der NMR-spektroskopischen Methoden sind in Kapitel 7 beschrieben.

2 Bindungsstudien des aktiven Konformers von Dolastatin 10 in Gegenwart von Tubulin

In diesem Kapitel werden die Bindungsstudien von synthetisierten Dolastatin 10-Derivaten in Gegenwart des Proteins Tubulin mit *in vitro*- und NMR-spektroskopischen Methoden vorgestellt. Der antimitotisch wirkende Naturstoff Dolastatin 10 liegt in Lösung in zwei stabilen Konformeren vor, welche sich in ihrer Wirkung bezüglich ihres Zielmoleküls Tubulin unterscheiden sollten. Die Klärung dieser Frage ist bei der Suche nach neuen cytotoxischen Wirkstoffen hilfreich.

2.1 Einführung

2.1.1 Dolastatine

Auf der Suche nach Zellwachstum inhibierenden, antineoplastischen marinen Naturstoffen wurden 1987 aus dem im West-Indischen Ozean vorkommenden Weichtier *Dolabella auricularia* insgesamt 15 Substanzen isoliert, welche cytostatische Eigenschaften aufweisen [4]. Die sogenannten Dolastatine bestehen zum Teil aus zyklischen Peptiden und Depsipeptiden. Wegen ihrer starken cytostatischen Wirkung stehen besonders Dolastatin 10 (Abb. 2.1) und Dolastatin 15 (Abb. 2.2) im Interesse der Krebsforschung am National Cancer Institute (NCI) und befinden sich in der klinischen Phase I und II [5].

Die Isolierung und Bestimmung der Konstitution von Dolastatin 10 wurde 1987 von Pettit *et al.* [6] beschrieben. Die absolute Konfiguration der neun stereogenen Zentren von Dolastatin 10 wurde durch Totalsynthese geklärt [7]. Das Tetrapeptid Dolastatin 10 besteht aus fünf Untereinheiten mit zum Teil nicht-proteinogenen Aminosäuren,

nämlich Dolavalin (Dov), Valin (Val), Dolaisoleuin (Dil), Dolaproin (Dap) und Dolaphenin (Doe).

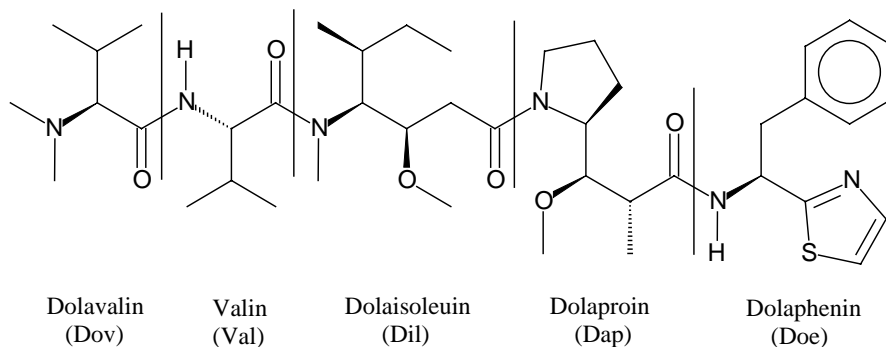


Abb. 2.1: Strukturformel von Dolastatin 10

Dolastatin 15 wurde 1989 von Pettit *et al.* [8] isoliert und seine Konstitution und Konfiguration aufgeklärt [9]. Neben den zum Teil N-methylierten natürlichen Valinen und Prolinen enthält es auch die ungewöhnlichen Bestandteile 2-Hydroxyvaleriansäure (Hiva) und das Dolapyrrolidon (Dpy).

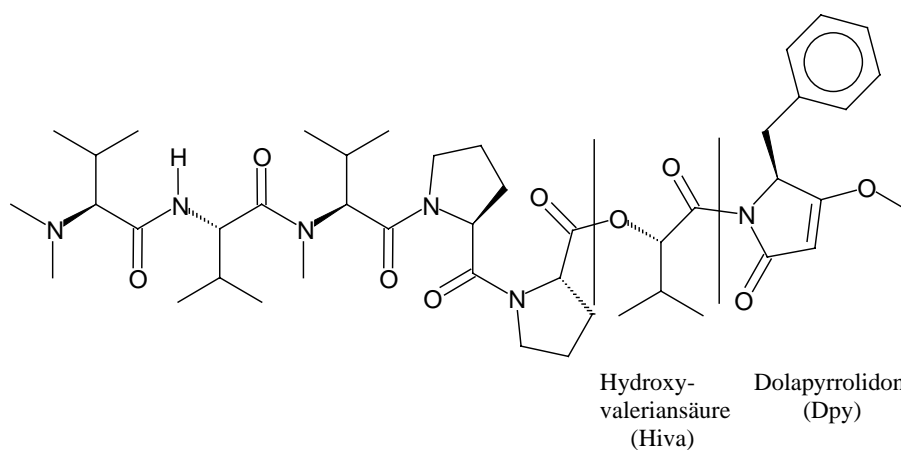


Abb. 2.2: Strukturformel von Dolastatin 15

Zwischen 1993 und 1995 gelang es Yamada *et al.* [10] aus *Dolabella auricularia*-Spezies vor der Pazifik-Küste Japans weitere Dolastatine zu isolieren. Darunter befand sich auch das dem Dolastatin 10 ähnliche Dolastatin H (Abb. 2.3). Es besitzt eine mit Dolastatin 10 vergleichbare Cytotoxizität.

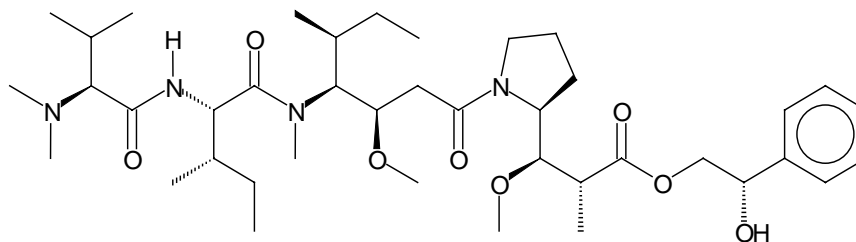


Abb. 2.3: Strukturformel von Dolastatin H

Inzwischen konnte aus den marinen Cyanobakterien *Symploca hydnoides* in der Nähe von Guam, Hawaii, eine dem Dolastatin 10 sehr ähnliche Verbindung, das Symplostatin 1, isoliert werden, bei der sich in der ersten Untereinheit eine Isoleucin-Seitenkette anstelle der Valin-Seitenkette im Dolavalin des Dolastatin 10 befindet [11]. So konnte nun die Annahme bestätigt werden, daß das Weichtier *Dolabella auricularia* die Dolastatine über seine Nahrung, Algen, aufnimmt.

2.1.2 Colchicin

Colchicin (Abb. 2.4) wurde 1820 als Hauptalkaloid im Samen der Herbstzeitlosen *Colchicum autumnale* isoliert [12] und findet seit 1932 Anwendung in der Behandlung von Gicht [13].

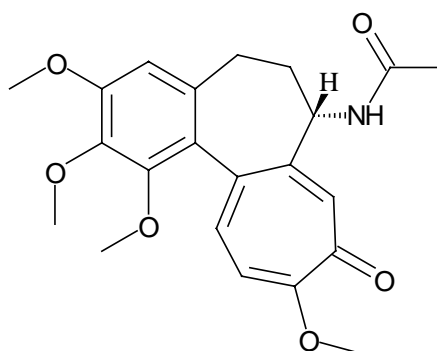


Abb. 2.4: Strukturformel von Colchicin

Colchicin besteht aus drei zum Teil aromatischen Ringsystemen und besitzt nur ein stereogenes Zentrum, dessen absolute Konfiguration durch Ozonolyse bewiesen wurde [14].

Die cytostatischen Eigenschaften von Colchicin sind seit ca. 1950 bekannt [15], allerdings kann es wegen seiner Toxizität nur als Kombinationspräparat zusammen mit Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason in der Krebstherapie eingesetzt werden [16].

2.1.3 Tubulin und Mikrotubuli

Tubulin ist das Monomer der Mikrotubuli, welche zylinderförmige Strukturen von 250 Å Durchmesser darstellen (Abb. 2.5) und hauptsächlich am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt sind [17]. Das Cytoskelett selbst als eine ausgedehnte Anordnung von Filamenten gibt der Zelle ihre Gestalt und ermöglicht sowohl die äußere Zellbewegung als auch die intrazelluläre Bewegung und Umgestaltung der Organellen.

Bei der Zellteilung spielen die Mikrotubuli eine zentrale Rolle, indem sie, zusammen mit assoziierten Proteinen, die mitotischen Spindeln bilden und für die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen sorgen. Mikrotubuli sind auch am Aufbau der Zilien, feiner, haarähnlicher Zellfortsätze, beteiligt, die ihrerseits in Körper- bzw. Organ Hohlräumen (Darmlumen, Atemkanäle) dem Transport von Partikeln oder Flüssigkeit dienen.

Mikrotubuli bestehen zu etwa 80 % aus Tubulinpolymeren und bis zu 20 % aus Mikrotubuli assoziierten Proteinen (MAPs), wobei letztere eine vom Organismus und dem Gewebe abhängige Struktur und Funktion aufweisen.

Tubulin stellt ein aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebautes Dimer dar (Abb. 2.5), wobei jede der Tubulinuntereinheiten aus ca. 450 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa hat. Das Heterodimer Tubulin besitzt demzufolge ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa. Zwischen den Tubulingenen des α - und β -Typs besteht eine Homologie von 35-40 %. Aus zahlreichen posttranslatorischen

Modifikationen resultiert eine Vielzahl ähnlicher Tubuline, die für die unterschiedlichen Funktionen der Mikrotubuli in der Zelle verantwortlich sind.

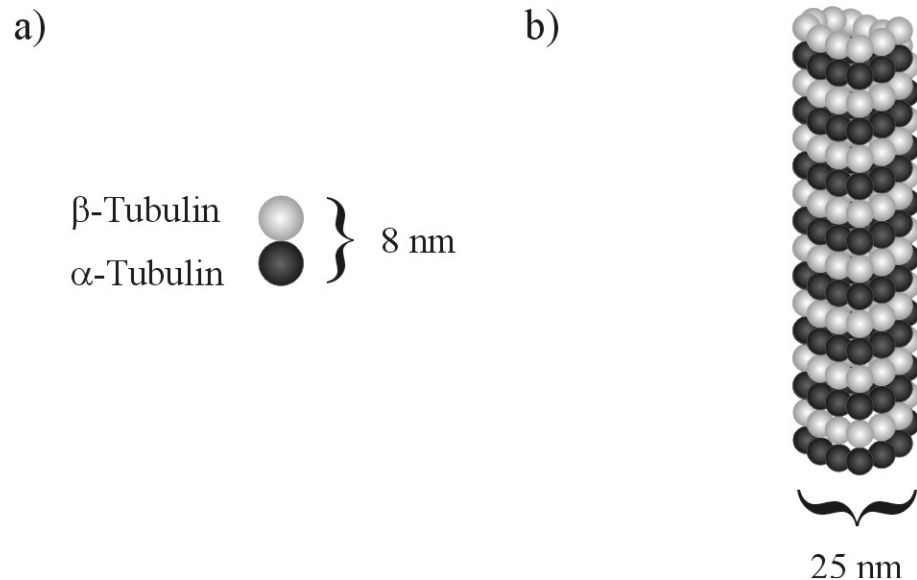


Abb. 2.5: Aufbau a) des Heterodimers Tubulin und b) der Mikrotubuli

Bei niedrigen Temperaturen und in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen nimmt Tubulin eine wasserlösliche protomere Form an, welche nur in Gegenwart von denaturierenden Reagenzien in die α - und β -Untereinheit dissoziiert. Unter physiologischen Bedingungen, in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen, GTP und MAPs, hingegen polymerisiert Tubulin zu Mikrotubuli in einem Prozeß, in dem jedes Tubulinheterodimer zwei GTP-Moleküle bindet. Ein GTP-Molekül befindet sich in der α -Untereinheit und verbindet die beiden Untereinheiten im Heterodimer, wie in einer elektronenkristallographischen Studie von Mikrotubuli, welche durch Taxol stabilisiert wurden, gezeigt werden konnte (Abb. 2.6) [18]. Es kann nicht hydrolysiert werden und wird deshalb auch das nicht austauschende GTP (N-Bindungsstelle) genannt. Das zweite GTP-Molekül bindet an eine austauschende (E-) Bindungsstelle der β -Untereinheit und wird beim Einbau eines $\alpha\beta$ -Dimers in einen Mikrotubulus zu $\text{GDP} + \text{P}_i$ gespalten.

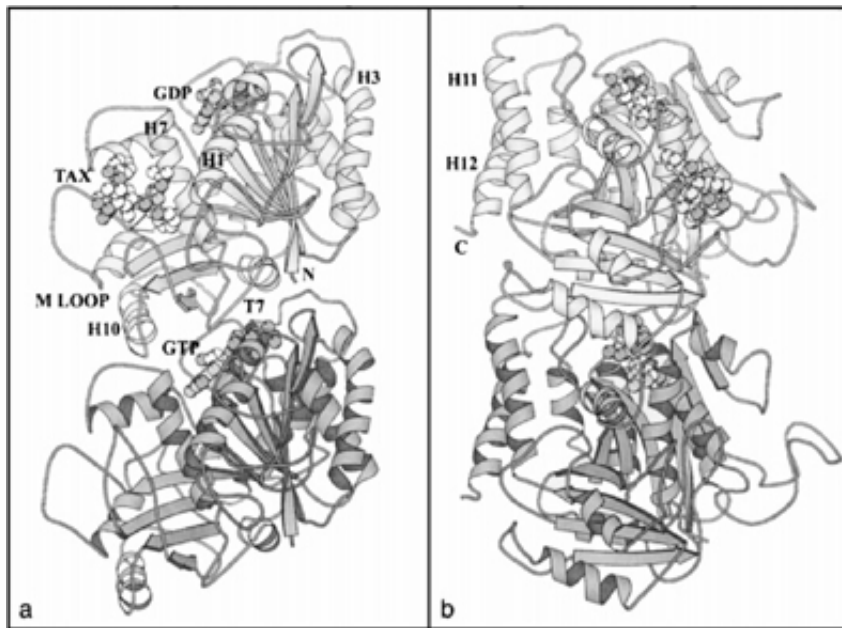


Abb. 2.6: Ribbon-Darstellung des Tubulin-Heterodimers aus zwei Blickwinkeln [18]. Die β -Untereinheit des Tubulins befindet sich in der oberen Hälfte. Es sind die Nucleotide GTP und GDP und Taxol (TAX) eingezeichnet.

Mikrotubuli sind zylinderförmige Gebilde, welche aus 13 parallelen, gestaffelten Protofilamenten aufgebaut sind und eine linkshändige, dreigängige helikale Anordnung von α - und β -Tubulinuntereinheiten darstellen, welche Kopf-an-Schwanz angeordnet sind [17].

Die sich zu Beginn der Polymerisation verbindenden $\alpha\beta$ -Dimere bilden zuerst ein Nukleationszentrum für den Aufbau der Protofilamente (Abb. 2.7). Das Wachstum setzt sich dann sowohl entlang der Achse des ersten Protofilaments als auch senkrecht dazu fort, bis sich das wachsende Molekül so um die Achse der Protofilamente windet, daß die Randfilamente unter Bildung eines Mikrotubulus verschmelzen. Ab diesem Zeitpunkt erfolgt das Wachstum nur noch an den Enden des Tubulus.

Die Mikrotubuli sind polare Strukturen, welche aus der regelmäßigen Anordnung der Tubulin-Moleküle resultieren. Dies führt zu Unterschieden zwischen den beiden Enden, die sich auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Mikrotubulus auswirken. So beobachtet man *in vitro* ein dreifach schneller wachsendes Ende, den Plus-Pol, und ein langsamer

wachsendes Ende, den Minus-Pol. In der Zelle sind die Mikrotubuli mit ihrem Minus-Pol zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MOC), mit ihrem Plus-Pol zur Zell-peripherie hin orientiert.

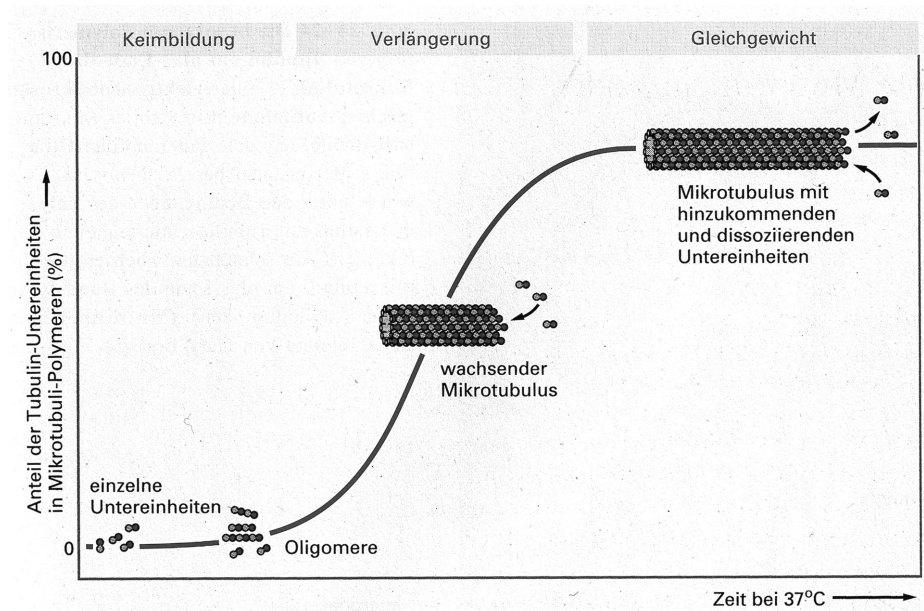


Abb. 2.7: *in vitro*-Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli

Ein besonderes Merkmal der Mikrotubuli ist ihre dynamische Instabilität, welche sich durch einen ständigen Auf- und Abbau der Protofilamente bemerkbar macht. Wenn ein GTP-Molekül in der β -Untereinheit des Tubulins am Plus-Pol des Mikrotubulus hydrolysiert wird, bevor sich ein anderes GTP-Heterodimer daran bindet, dann erfolgt eine schnelle Dissoziation des resultierenden GDP-Heterodimers vom Mikrotubulus. Der Aufbau der Mikrotubuli ist also stark abhängig von der Hydrolysegeschwindigkeit, mit der Tubulin GTP spaltet, und der Verfügbarkeit von GTP-Heterodimeren. Selbst wenn die Mikrotubuli eine konstante Länge beibehalten, sind sie keinesfalls statisch: Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP getrieben, erfolgt die Addition von Tubulin-untereinheiten an den Plus-Pol mit derselben Geschwindigkeit wie die Dissoziation von Tubulinuntereinheiten vom Minus-Pol.

Über die Regulation der Tubulinpolymerisationsgeschwindigkeit variieren Zellen ihre Gestalt und induzieren die Bildung und den Abbau von zellulären Apparaten wie der mitotischen Spindeln während der Zellteilung.

2.1.4 Zellzyklus

Zellen unterliegen einem charakteristischen Lebenszyklus (Abb. 2.8), der stark von der Funktion der einzelnen Zelle abhängig ist [19]. Befindet sich die Zelle in einem Zustand, in dem keine Vermehrung stattfindet, so nennt man diese Phase die G_0 - oder Ruhephase. Die Geschwindigkeit der Zellproliferation wird über die Anzahl der Zellen festgelegt, die sich gerade replizieren. Je nach der Populationsdichte der jeweiligen Zellen verbleiben diese also in der Ruhephase oder treten, induziert durch gewebspezifische Wachstumsfaktoren oder eine interne Steuerung, in das G_1 -Stadium der Interphase ein. Dem G_1 -Stadium, einer ersten Wachstumsperiode, folgt die S-Phase, in der die Replikation der DNA, der Histone (Gruppe von basischen Proteinen, die sich salzartig an die DNA heften) und der MOCs stattfindet. Die G_2 -Phase als zweite Wachstumsphase bereitet die Zelle auf die Mitose vor, indem hier unter anderem zusätzliches Tubulin produziert wird.

In der anschließenden Mitose unterscheidet man zwischen Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase: In der Prophase verdichtet sich das duplizierte Chromatin (DNA-Histon-Komplex in Form langer dünner Fäden) zu Chromosomen (schraubig aufgerollte Chromatindoppelfäden, die über Kinetochore, Einschnürstellen, zusammengehalten werden), lösen sich die Nucleoli zusammen mit der Kernmembran auf, und aus einem Tubulinpool entsteht der Spindelapparat. Die Spindelfasern bestehen aus Mikrotubuli, die sich um die MOCs anordnen und sich sowohl von Zellpol zu Zellpol als auch zu den einzelnen Chromosomen entwickeln.

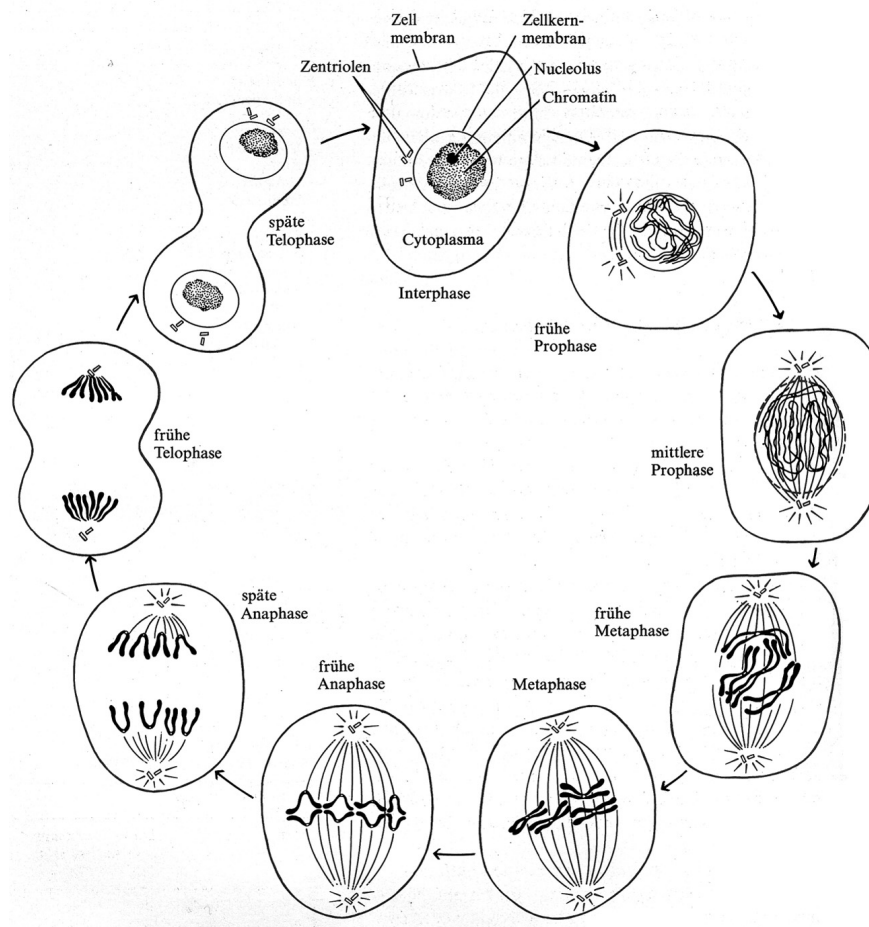


Abb. 2.8: Stadien der Zelle während der Mitose

Der Prophase folgt die Metaphase, in der sich die Chromosomen über ihre Kinetochore an die Spindelfasern heften und sich über eine Zugwirkung der Spindelfasern in einer Äquatorialebene der Zelle ausrichten. Ohne Verbindung von Kinetochor und Spindelfasern kommt keine Chromosomenwanderung und damit keine Zellteilung zustande. Am Ende der Metaphase teilen sich die Kinetochore. Die Trennung der Chromatide erfolgt in der Anaphase, wobei gleichzeitig die Pole des Spindelapparates die Zelle durch weitere Mikrotubuli auseinander drücken. In der Telophase erreichen die Chromatide die Pole der Spindel, die Kernmembran und die Nucleoli werden wieder aufgebaut und Organellen und Cytosol trennen sich in einem Cytokinese genannten Prozeß. Es entstehen zwei neue Zellen, die die gleiche Erbinformation tragen und zur weiteren Replikation fähig sind.

Der Zellzyklus wird normalerweise über lineare Kontrollmechanismen gesteuert. Sind diese außer Kraft gesetzt, sterben die Zellen ab oder entwickeln sich über einen veränderten Stoffwechsel zu Tumorzellen, welche eine übermäßige Replikationsrate besitzen.

2.1.5 Bindung von Dolastatin 10 und Colchicin an Tubulin

Der Angriffspunkt für antimitotisch wirkende Substanzen ist das zelluläre Mikrotubuli-System, welches während der Mitose für die Separation der Chromosomen verantwortlich ist. Viele der zugelassenen Arzneistoffe, wie zum Beispiel die Vinca-Alkaloide oder Colchicin, binden an Tubulin und verhindern so dessen Polymerisation. Die Chromosomen können sich nicht separieren und die Zellen verbleiben in der Metaphase. Dies erklärt die antineoplastische Wirkung derartiger Substanzen.

Dolastatin 10 bindet spezifisch an das Tubulin [20] und verhindert dessen Polymerisation zu Mikrotubuli *in vitro* mit einem IC_{50} -Wert von $1.2 \mu M$. Außerdem beobachtet man die Inhibierung der Tubulin-abhängigen Hydrolyse von GTP sowie den GDP-GTP-Austausch in der β -Untereinheit des Tubulins. Durch Verdrängungsstudien mit anderen an Tubulin bindenden Substanzen konnte die Lage der Dolastatin 10-Bindungsstelle an Tubulin (Abb. 2.9) bestimmt werden [21].

Dolastatin 10 hemmt nicht-kompetitiv die Bindung von Vincristin, einem Vinca-Alkaloid, und von GTP an Tubulin. Durch die Beeinflussung kann auf eine räumliche Nähe der Bindungsstellen der Vinca-Alkaloide, Dolastatin 10 und GTP geschlossen werden. Darüber hinaus inhibiert Dolastatin 10 die Bindung von Phalloidin A und Rhizoxin kompetitiv, welches auf die gleiche Bindungsstelle hinweist [22]. Außerdem wird die Bindung von Colchicin an Tubulin durch Dolastatin 10 stabilisiert [21].

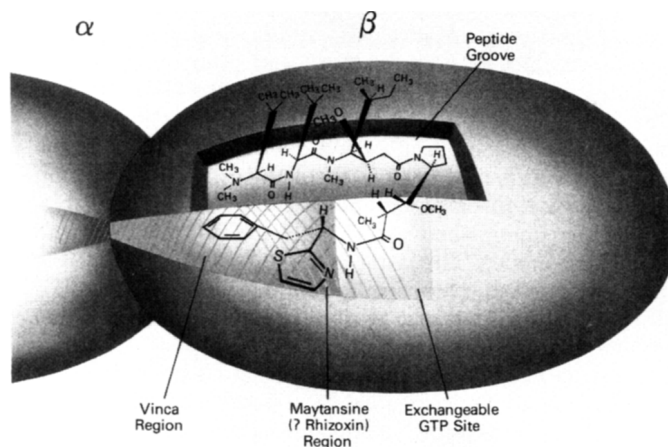


Abb. 2.9: Bindungsmodell der Wechselwirkung von Dolastatin 10 mit der β -Untereinheit von Tubulin nach Hamel [21]

Ein Dolastatin 10-Fragment bestehend aus Dolavalin-Valin-Dolaisoleuin-OtBu bindet ebenfalls an Tubulin und verhindert dessen Polymerisation mit einem IC_{50} -Wert von $4.2 \mu M$ [23]. Auch konnte durch Variation der stereogenen Zentren in der Dolaisoleuin-Einheit gezeigt werden, daß diese für die Bindung an Tubulin essentiell sind. Daher ist anzunehmen, daß dieser Teil des Dolastatin 10 für die spezifische Bindung an das Tubulin entscheidend ist und die Dolaproin-Dolaphenin-Einheit nur die benachbarten Bindungsstellen sterisch abschirmt. Das erwähnte Dolastatin 10-Fragment weist allerdings keinen cytostatischen Effekt auf [24].

Über die Bindung von Colchicin an Tubulin existiert eine genauere Vorstellung, weil seine antimitotische Eigenschaft relativ früh bekannt war [15]. Bei einer der ersten Tubulin-Präparationen wurde die Stärke des Tubulin-Colchicin-Komplexes ausgenutzt, um Tubulin aufzureinigen [25]. Tubulin wurde damals als „Colchicin-bindendes Protein“ bezeichnet.

Colchicin bindet an Tubulin in einem Zwei-Stufen-Prozeß [26]. Zunächst bildet sich schnell ein reversibler Tubulin-Colchicin-Komplex mit geringer Affinität und einer Gleichgewichtskonstanten von $6 \times 10^3 M^{-1}$. Durch eine konformationelle Umlagerung sowohl im Tubulin als auch im Colchicin entsteht ein stabiler Tubulin-Colchicin-

Komplex mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, welcher an den Enden der Mikrotubuli eingebaut wird [27] und so die fortschreitende Polymerisation der Mikrotubuli inhibiert. Daraus resultiert eine stöchiometrische Bindung von Colchicin an Tubulin und eine substöchiometrische Inhibierung der Tubulin-Polymerisation. Das freie Colchicin wird nicht in bestehende Mikrotubuli eingebaut.

Die Bindungsstelle des Colchicin am Tubulin (Abb. 2.10) befindet sich in der β -Untereinheit [28], allerdings kann die räumliche Nähe zu der α -Untereinheit nicht ausgeschlossen werden, weil Colchicin die Affinität der α - zur β -Untereinheit im Tubulin erhöht [29].

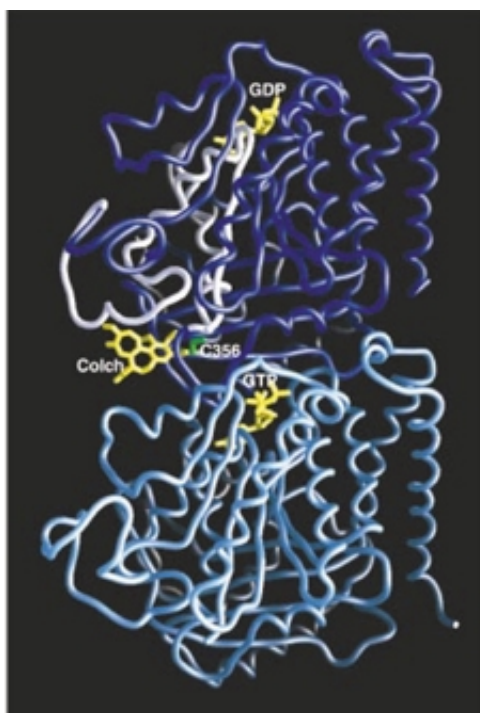


Abb. 2.10: Bindungsmodell der Wechselwirkung von Colchicin mit Tubulin [29, 30, 31]. Die β -Untereinheit des Tubulins ist in der oberen Hälfte in dunkelblau dargestellt.

Durch *cross linking*-Experimente konnte die Bindungsregion in der β -Untereinheit des Tubulin eingeschränkt werden [29, 30]. Besonders die Aminosäuren 1-36, 216-243 und Cys356 zeigen in Gegenwart von $[^3\text{H}]$ -Colchicin nach Bestrahlung mit UV-Licht und enzymatischem Abbau des Proteins eine kovalente Verknüpfung mit der Verbindung.

Das daraus resultierende Modell der Bindung von Colchicin an Tubulin ist nach dem Erscheinen der Kristallstruktur (Abb. 2.6) [18] von Downing [31] erstellt worden (Abb. 2.10). Die Bindung von Colchicin erfolgt sowohl über den Trimethoxybenzol- als auch über den Tropolon-Ring an der β -Untereinheit, während der verbleibende Siebenring mit seinem N-Acetyl-Substituenten in Richtung der α -Untereinheit zeigt [32].

Colchicin beeinflusst nicht die Bindung der Vinca-Alkaloide an Tubulin, so daß hier keine räumliche Nähe der Bindungsstellen bestehen dürfte [33].

2.1.6 Taxol und Epothilone

Einer weiteren interessanten Wirkstoffklasse, welche eine von Dolastatin 10 und Colchicin unterschiedliche Wirkung auf die Tubulin-Polymerisation besitzt, gehören Taxol und die Epothilone (Abb. 2.11) an.

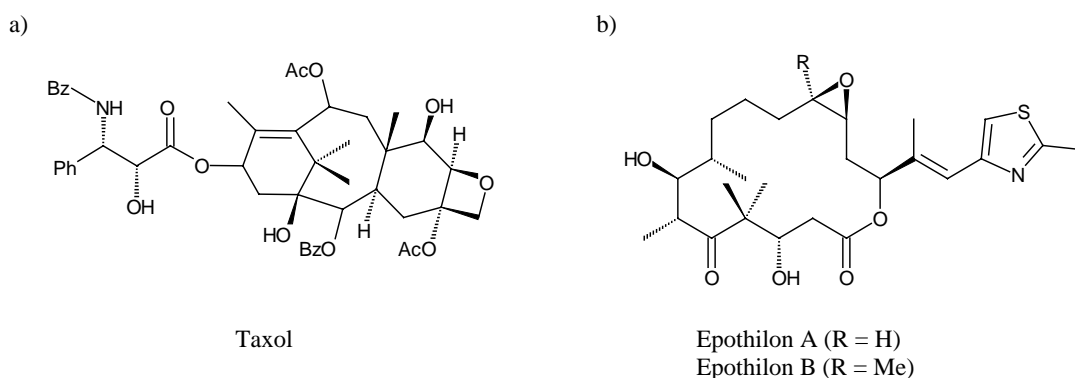


Abb. 2.11: Strukturformel von a) Taxol und b) Epothilon A und B

Das komplexe Diterpen Taxol (Paclitaxel) wurde 1971 in der Rinde der Pazifischen Eibe entdeckt [34] und findet Anwendung in der Behandlung von einer Vielzahl von soliden Tumoren, die häufig bei Ovarial- und Brustkrebs vorgefunden werden [35]. Die Epothilone A und B wurden in den späten 80er Jahren aus Kulturextrakten des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* isoliert [36] und zeigen eine hohe Aktivität gegen eine Reihe von Krebszellen, darunter einige Brust- und Darmkrebszelllinien [37].

Sowohl Taxol als auch die Epothilone induzieren bei tiefen Temperaturen und in Abwesenheit von GTP und MAPs die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli und stabilisieren die Mikrotubuli [38]. Hierdurch wird das Gleichgewicht zwischen Tubulin und dem Polymer gestört, welches für den ständigen Auf- und Abbau der Mikrotubuli z.B. während der Mitose notwendig ist. Epothilon A und B verdrängen außerdem Taxol kompetitiv aus den [^3H]Taxol-Mikrotubulus-Komplexen. Eine besondere Eigenschaft der Epothilone ist die Zerstörung von Tumorzellen, welche eine Resistenz gegen viele Wirkstoffe, z. B. auch Taxol, aufweisen [39]. Taxol und die Epothilone binden an die gleiche Stelle in der β -Untereinheit des polymerisierten Tubulins [38, 39]. In einer elektronenkristallographischen Studie von Mikrotubuli [18], welche durch Taxol stabilisiert wurden, konnte zum einen die dreidimensionale Struktur des polymerisierten Tubulins aufgeklärt werden und zum anderen die Bindungsstelle des Taxols in der β -Untereinheit des Tubulins dargestellt werden (Abb. 2.6).

2.1.7 Bindungsstellen von antimitotischen Wirkstoffen an Tubulin

Die beschriebenen antimitotischen Wirkstoffe Dolastatin 10, Colchicin, Taxol und Epothilon A und B binden an unterschiedliche Regionen in der β -Untereinheit des Tubulins. In Abb. 2.12 ist eine Zusammenfassung der mutmaßlichen Bindungsstellen der Verbindungen gezeigt [31].

Die Taxol-Bindungsstelle ist aus der Kristallstruktur bekannt [18] und entspricht der der Epothilone A und B. Sie befindet sich seitlich in der β -Untereinheit des Tubulins. Man vermutet, daß durch die Bindung von Taxol oder Epothilon A und B die seitlichen Kontakte zwischen den Protofilamenten stabilisiert werden [18].

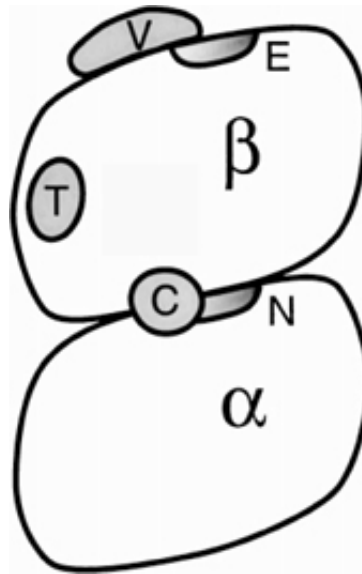


Abb. 2.12: Zusammenfassung der mutmaßlichen Bindungsstellen von antimitotischen Wirkstoffen am Tubulin [31]. Die Bindungsstelle von Taxol (T) ist aus der Kristallstruktur bekannt [18] und entspricht der der Epothilone A und B. Die Bindungsstelle des Colchicins (C) befindet sich in der Nähe der Verbindung von α - und β -Untereinheit des Tubulins, während sich die Bindungsstelle der Vinca-Alkaloide (V) in der Nähe des austauschenden Nucleotides (E) befindet. Das nicht-austauschende Nucleotid ist mit N bezeichnet. Die Bindungsstelle der MAPs in der β -Untereinheit des Tubulins befindet sich auf der Rückseite des abgebildeten Heterodimers.

Die Bindungsstelle des Colchicins ist in der Nähe der Verbindung von der α - und β -Untereinheit des Tubulins (Abschnitt 2.1.5). Die Bindungsstelle des Dolastatin 10 lässt sich aus der der Vinca-Alkaloide ableiten, weil Dolastatin 10 die Bindung der Vinca-Alkaloide nicht-kompetitiv inhibiert [21] und deshalb eine räumliche Nähe der beiden Bindungsstellen angenommen werden kann. Sie befinden sich am oberen Ende der β -Untereinheit des Tubulins nahe dem austauschenden Nucleotid.

2.1.8 Cytotoxizität von Dolastatin 10

Zellen, die mit Dolastatin 10 behandelt wurden, reichern sich in der G_2 -Phase an und sterben nach vierstündiger Inkubation [40]. Das stark cytotoxisch wirkende Dolastatin 10 zeigt gegenüber zahlreichen Krebszellstämmen subnano- bzw. nanomolare IC_{50} -Werte [41], z. B. gegen L1210-Leukämie-Zellen in Mäusen beträgt der IC_{50} -Wert $9 \cdot 10^{-10}$ M [24]. Durch die übermäßige Teilungsrate von Krebszellen im Vergleich zu normalen Körperzellen sind diese während der Mitose durch die entsprechenden Inhi-

bitoren besonders angreifbar. Inzwischen befinden sich Dolastatin 10 und Dolastatin 15 [42], ein Dolastatin 10-Derivat (TZT-1027) [43] und ein Dolastatin 15-Derivat (Cemadotin) [44] in den klinischen Phasen I und II.

2.1.9 Konformationsanalyse von Dolastatin 10

Die Struktur von Dolastatin 10 wurde von Dr. J. Quant mit Hilfe von zweidimensionalen NMR-Experimenten (DQF-COSY, TOCSY, ROESY, P.E.COSY) bei 310 K in Methanol untersucht [45]. Eine Röntgenstrukturanalyse konnte nicht durchgeführt werden, weil Dolastatin 10 eine nicht-kristalline Verbindung darstellt. Man beobachtet das Auftreten zweier Hauptkonformere im Verhältnis 1:1, welche durch cis-trans-Isomerisierung um die Peptidbindung zwischen der Dolaisoleuin- und der Dolaproin-Einheit zu erklären sind. Dieses Ergebnis wurde durch ähnliche Experimente an Dolastatin 10 in DMSO von P. Jouin *et al.* bestätigt [46].

Das cis-Konformer des Dolastatin 10 besitzt eine gebogene Struktur, während das trans-Konformer eine linear gestreckte Struktur einnimmt.

Die ersten drei Einheiten von Dolastatin 10 (Dolavalin, Valin und Dolaisoleuin) binden an das Tubulin, während die verbleibenden beiden Einheiten (Dolaproin und Dolaphenin) bedingt durch die cis-trans-Isomerie der verknüpfenden Peptidbindung sehr unterschiedlich angeordnet sind. Deshalb stellt sich nun die Frage, welches der beiden Hauptkonformere an das Tubulin bindet und für die biologische Wirkung verantwortlich ist.

2.1.10 Kinetik der Bindung von Dolastatin 10 an Tubulin

Die beiden Hauptkonformere von Dolastatin 10 sollten ein unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber Tubulin besitzen (Abb. 2.13).

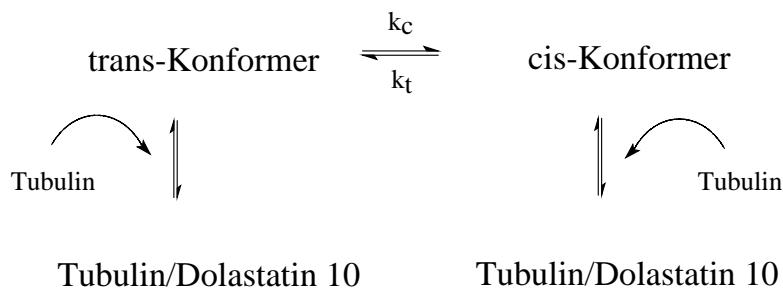


Abb. 2.13: Modell der Bindung von Dolastatin 10 an Tubulin

Unter Berücksichtigung der cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung zwischen der Dolaisoleuin- und der Dolaproin-Einheit sollten sich die beiden Konformere mit einer unterschiedlichen Kinetik an des Tubulin anlagern.

2.1.11 Aufgabenstellung

Das Ziel der Untersuchungen ist die Beantwortung der Frage, welche Konformation von Dolastatin 10 an das Tubulin bindet. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen sollte durch die Synthese von zyklischen Dolastatin 10-Derivaten das cis-Konformer durch Verknüpfung des C-Terminus mit dem N-Terminus stabilisiert werden. Hierbei konnte auf strukturelle Vereinfachungen im Dolastatin 10 zurückgegriffen werden, welche von Dr. M. Boretzki [47] und Dr. D. Belik [48] im Rahmen von Struktur-Wirkungsstudien am Dolastatin 10 untersucht wurden. Die zyklischen Peptide sollten bei Tubulin-Polymerisationsstudien niedrigere IC_{50} -Werte als Dolastatin 10 ergeben, wenn das cis-Isomer die an das Tubulin bindende Konformation ist.

In dem zweiten Ansatz sollte mit einem entsprechenden ^{15}N -markierten Dolastatin 10-Derivat die Bindung an Tubulin NMR-spektroskopisch verfolgt werden.

2.2 Durchführung

2.2.1 Synthesepanung der zyklischen Dolastatin 10-Derivate

Als Zielverbindungen wurden zyklische Peptide angestrebt, welche das cis-Isomer des natürlichen Dolastatin 10 stabilisieren sollten. Anstelle der Dolaisoleuin-Einheit wurde die Dolavain-Einheit (Dav, Abb. 2.14) verwendet, welche eingebaut in das Tripeptid Dov-Val-Dav-OtBu einen IC_{50} -Wert von $5\text{ }\mu\text{M}$ bei der Inhibierung der Tubulin-Polymerisation besitzt [47].

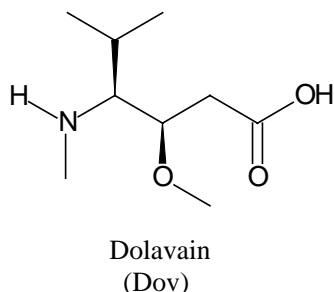


Abb. 2.14: Strukturformel des Dolavains

Das vergleichbare Tripeptid des Dolastatin 10 erreicht einen IC_{50} -Wert von $4.2\text{ }\mu\text{M}$ [23], so daß man ohne Verlust an Aktivität die *iso*-Butylseitenkette des Dolaisoleuins durch die *iso*-Propylseitenkette des Dolavains ersetzen kann.

Das synthetisch aufwendige Dolaproin kann für die angestrebten Untersuchungen durch *S*-Prolin ersetzt werden, welches ebenfalls stabile cis-trans-Isomere ausbildet. Zwar beobachtet man bei Cytotoxizitätsstudien, daß die Aktivität um den Faktor 100 im Vergleich zu Peptiden mit Dolaproin schlechter wird [48]. Für die Bindung an Tubulin ist Dolaproin allerdings nicht essentiell [23].

Daraus resultieren folgende Verbindungen als Zielmoleküle:

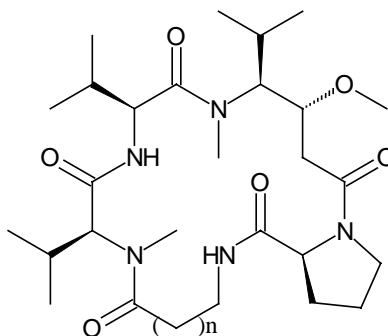


Abb. 2.15: Zyklische Dolastatin 10-Derivate; $n = 2, 4, 6$

Die Kettenlänge des aliphatischen Linkers in Form von Aminocarbonsäuren wurde aus der Lösungsstruktur des *cis*-Konformers des Dolastatin 10 ermittelt [45]. Zwischen dem Carboxyl-Kohlenstoff des Dolaproin und dem Stickstoff des Dolaisoleuin besteht ein Abstand von ca. 7 Å.

2.2.2 Synthese der zyklischen Dolastatin 10-Derivate Teil 1

Die Synthese der γ -Aminosäure Dolavain (Abb. 2.16) wurde in Anlehnung an die Methode von Koga und seinen Mitarbeitern [49] realisiert.

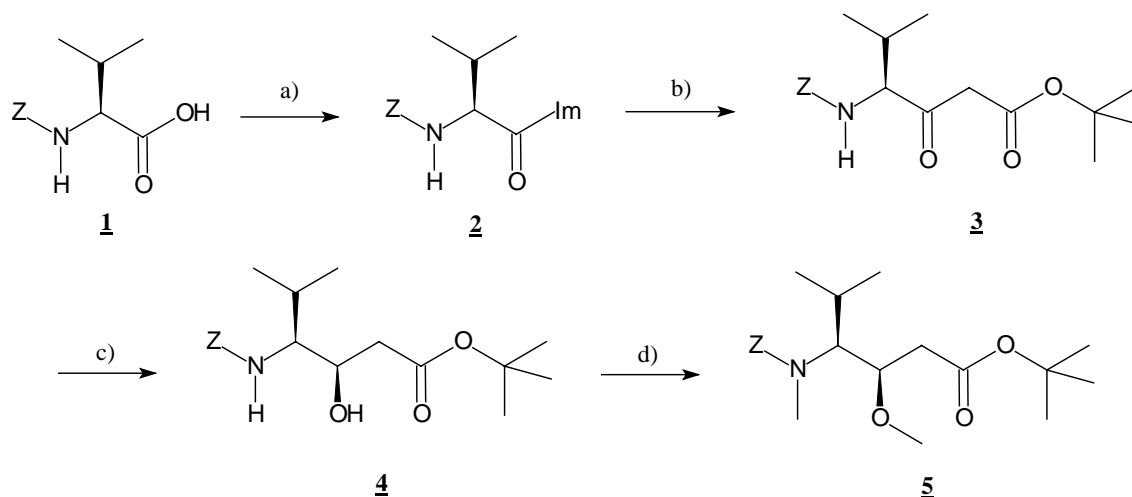


Abb. 2.16: Synthese von Dolavain: a) CDI, THF, 0 °C, 5 h, b) LDA, Essigsäure-*tert*.-butylester, THF, -78 °C, 2 h, 89 %, c) NaBH₄, MeOH, 0 °C, 8 h, 80 %, c) i. LiHMDS, HMPT, THF, -78 °C, 1 h, ii. MeOTf, THF, -78 °C, 3 h, 82 %

Nach der Aktivierung mit 1,1'-Carbonyldiimidazol von N-(Benzyloxycarbonyl)-*S*-Valin wurde die Verbindung mit *tert*.-Butyl-Lithium-Acetat in den β -Ketoester **3** mit einer Ausbeute von 89 % bezogen auf N-(Benzyloxycarbonyl)-*S*-Valin überführt. Die

Reduktion des Rohproduktes **3** mit NaBH_4 in Methanol bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ führte zu dem 3*R*-konfigurierten Alkohol **4** mit einer Ausbeute von 80 %. Die absolute Konfiguration von **4** wurde von Herrn Dr. M. Boretzky [47] überprüft. Die anschließende N- und O-Alkylierung wurde mit Trifluormethansulfonsäuremethylester als Alkylierungsmittel und Lithiumhexamethyldisilazid als Base bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Man erhielt die geschützte Dolavain-Einheit **5** mit einer Ausbeute von 82 %.

Für den Aufbau des linearen Tetrapeptides **10** (Abb. 2.17) wurde **5** zur N-terminalen Entschützung katalytisch hydriert und anschließend mit TBYCLU [50,51] als Kuppelungsreagenz, welches sich für die Umsetzung von N-methylierten Aminosäuren gut eignet, und mit Z-*S*-Valin mit einer Ausbeute von 62 % zum Dipeptid **6** umgesetzt.

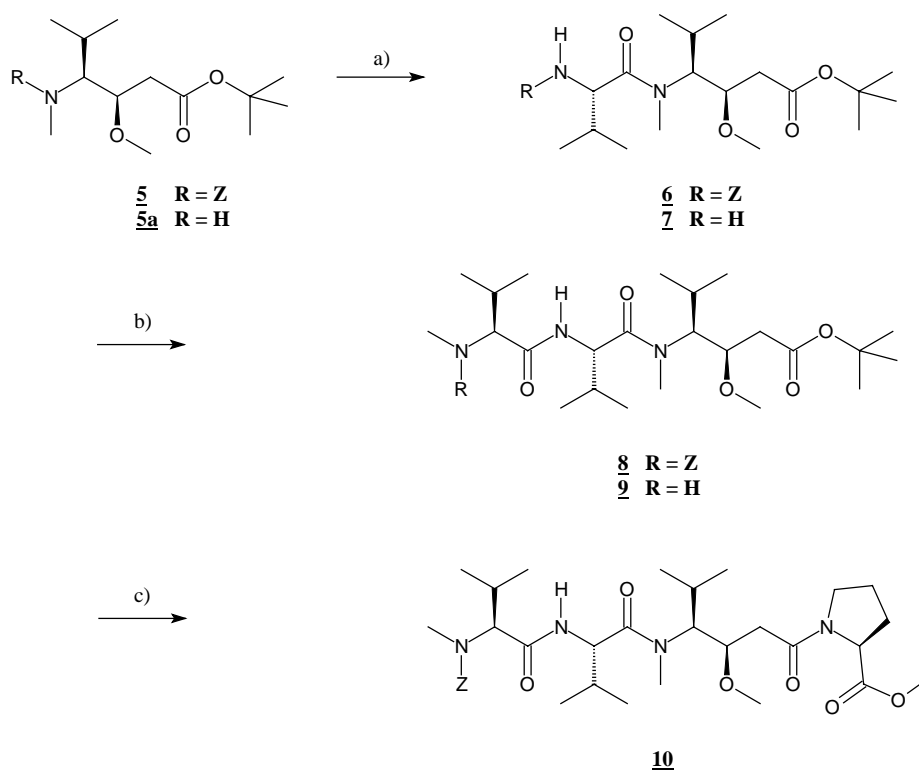


Abb. 2.17: Synthese des geschützten Tetrapeptides **10**; a) i. Pd/C , H_2 , MeOH , $25\text{ }^\circ\text{C}$, 91 %, ii. Z-*S*-Val, TBYCLU, DIEA, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h, 62 %, b) i. Pd/C , H_2 , MeOH , $25\text{ }^\circ\text{C}$, 97 %, ii. Z-*Me-S*-Val, PPA, DIEA, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h, 85 %, c) i. TFA, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h, ii. *S*-Pro-OMe*HCl, PPA, DIEA, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h, 71 %

Nach Abspalten der N-terminalen Schutzgruppe wurde mit PPA [52] zum geschützten Tripeptid **8** mit einer Ausbeute von 85 % gekuppelt.

Für die Synthese des geschützten Tetrapeptides **10** wurde **8** C-terminal mit Trifluoressigsäure entschützt und in Gegenwart von PPA mit *S*-Prolinmethylester mit einer Ausbeute von 71 % umgesetzt.

Die entsprechenden aliphatischen Aminocarbonsäuren wurden N-terminal mit Z bzw. mit Boc unter den angegebenen Reaktionsbedingungen geschützt. Zunächst wurde bei 8-Aminooctansäure die Boc-Schutzgruppe verwendet (Abb. 2.18), welche später Probleme bei der Entschützung bereitete. Man erhielt die geschützte Verbindung **12a** mit einer Ausbeute von 97 %.

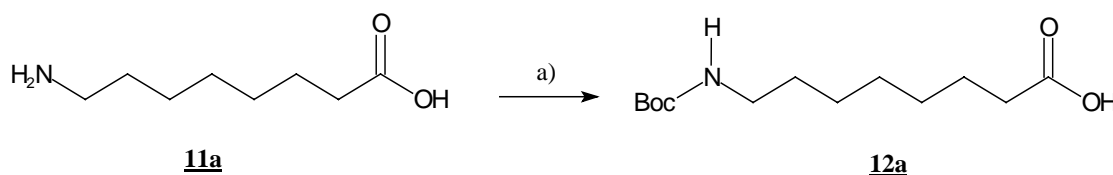


Abb. 2.18: Synthese von *N*-Boc-8-Aminooctansäure **12a**: a) Boc₂O, NaOH, Dioxan, 25 °C, 4 d, 97 %

Bei der 4-Aminobutansäure und 6-Aminohexansäure wurde N-terminal die Z-Schutzgruppe mit einer Ausbeute von 32 % für **12b** bzw. 41 % für **12c** eingeführt (Abb. 2.19).

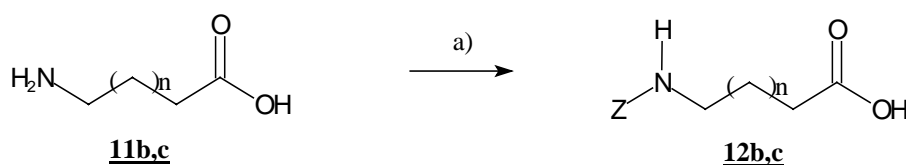


Abb. 2.19: Synthese von *N*-Z-4-Aminobutansäure **12b** und *N*-Z-6-Aminohexansäure **12c**, $n = 1, 3$, a) Z-Cl, NaOH, Dioxan, 0 °C, 32 bzw. 41 %

Nach der N-terminalen Entschützung von **10** wurden die N-terminal geschützten Aminocarbonsäuren unter Aktivierung von PPA zu den entsprechenden Tetrapeptiden **13a,b,c** mit aliphatischem Linker mit Ausbeuten von 71 - 92 % gekuppelt (Abb. 2.20).

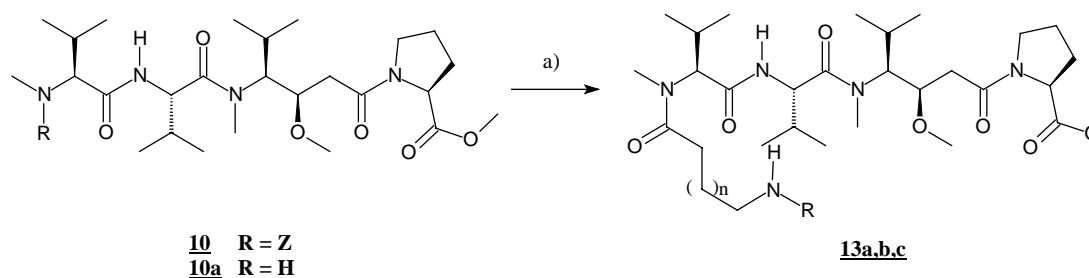


Abb. 2.20: Synthese der Tetrapeptide mit aliphatischem Linker **13a,b,c**, für $n = 5$ $\text{R} = \text{Boc}$ und für $n = 1, 3$ $\text{R} = \text{Z}$: a) i. Pd/C , H_2 , MeOH , 25°C , 1 h , 84% , ii. **12a,b,c**, PPA , DIEA , CH_2Cl_2 , 0°C , 48 h , $71 - 92\%$

Nach der C-terminalen Entschützung von **13a** wurde die N-terminale Schutzgruppe zunächst mit 25 % Trifluoressigsäure in Methylenchlorid abgespalten. Auf dem Dünnschichtchromatogramm und bei der analytischen HPLC wurden neben dem Produkt noch weitere Verbindungen entdeckt. Dies deutet auf mögliche Nebenreaktionen des sehr reaktiven tert.-Butyl-Kations hin, welche durch die Verwendung von Reagenz K [53] nicht mehr auftreten sollten. In den analytischen HPLC-Chromatogrammen wurden zwar weniger Nebenprodukte beobachtet, aber die Aufreinigung der Verbindung **13a** mit HPLC gestaltete sich schwierig. Deshalb wurden die entsprechenden Aminocarbonsäuren mit der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe für die beiden verbleibenden Kettenlängen eingesetzt, welche unter milderen Bedingung und ohne reaktive Zwischenstufen entfernt werden kann. Die Abspaltung der Z-Schutzgruppe von **13b,c** wurde hydrogenolytisch an Pd/C (10%) erreicht.

Die Macrolactamisierung wurde unter Aktivierung von HOBt und TBTU nach der Patentschrift von S. Henke [54] durchgeführt. Man erhielt die Verbindungen **16a,b,c** mit Ausbeuten von 51 - 81 % mit zunehmender Kettenlänge bezogen auf **15a,b,c** (Abb. 2.21).

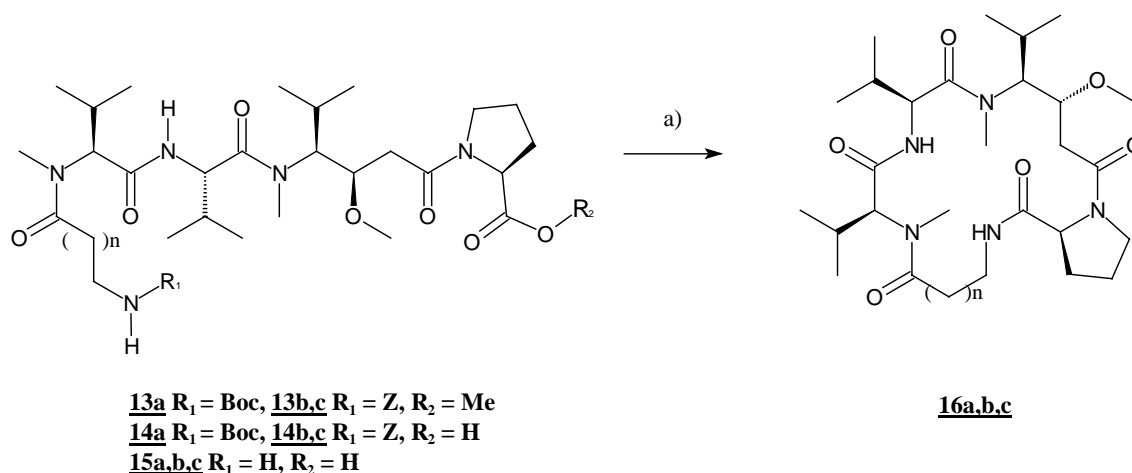


Abb. 2.21: Synthese der zyklischen Peptide **16a,b,c**, $n = 2, 4, 6$: a) i. NaOH, Dioxan, 25 °C, 24 h, 74 - 94 %, ii. HOBt, TBTU, DIEA, DMF, 0 °C, 24 h, 51 - 81 %

Bei der Zyklisierung wurde die Bildung von Dimeren nicht beobachtet.

2.2.3 NMR-spektroskopische Untersuchung der zyklischen Peptide Teil 1

Die drei synthetisierten zyklischen Peptide **16a,b,c** wurden NMR-spektroskopisch mithilfe von homonuclearen zweidimensionalen Experimenten bezüglich ihrer Konformation in Lösung untersucht, um die Stabilisierung des cis-Konformers durch die Zyklisierung zu überprüfen. Hierbei wurde eine Vielzahl von Konformeren beobachtet, welche besonders deutlich im H^{N} -Aliphaten-Bereich der TOCSY mit einer Mischzeit von 70 ms zu erkennen sind. In den Molekülen befinden sich nur zwei nicht N-alkylierte Fragmente, das Valin und die Aminocarbonsäuren, welche als verknüpfende Elemente fungieren. Deshalb würde man in dem genannten Bereich nur jeweils ein Spinsystem im TOCSY erwarten.

Im H^{N} -Aliphaten-Bereich der TOCSY der zyklischen Peptide in CDCl_3 in Abb. 2.22 sind viele unterschiedliche Konformere der zyklischen Peptide zu beobachten.

Für die Verbindung **16a** ($n = 6$) konnten insgesamt fünf und für die Verbindungen **16b** ($n = 2$) und **16c** ($n = 4$) jeweils vier Signalsätze zugeordnet werden. Im Falle von **16b**, dem zyklischen Peptid mit dem kürzesten Linker ($n = 2$), sind ein Teil der Signale durch Austausch verbreitert, welches auf eine große Ringspannung hindeutet. Dadurch

geht nicht nur die Peptidbindung zwischen der Dolavain- und der Prolin-Einheit eine cis-trans-Isomerisierung ein, sondern es werden auch die verbleibenden vier Peptidbindungen in cis- und trans-Konformere gezwungen. Dies erklärt die Vielzahl an Signalsätzen in den NMR-Spektren.

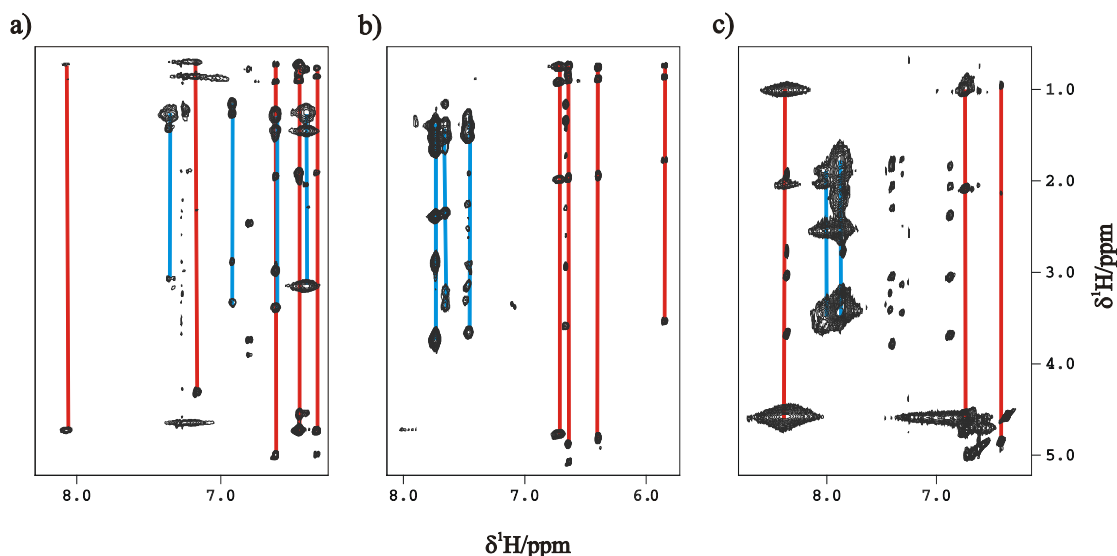


Abb. 2.22: H^N -Aliphaten-Bereich der TOCSY-Spektren der zyklischen Peptide **16a,b,c** in Abhängigkeit von der Kettenlänge, rot: Signale des Valins, blau: Signale des aliphatischen Linkers, für a) **16a** ($n = 6$) und b) **16c** ($n = 4$) AMX400, für c) **16b** ($n = 2$) DRX 600, $CDCl_3$, 300 K, $\tau_m = 70$ ms

Auch der Wechsel zu anderen Lösungsmitteln reduzierte nicht die Anzahl der Konformere in Lösung. Am Beispiel von **16a**, dem zyklischen Peptid mit dem längsten Linker ($n = 6$), wurden homonucleare NMR-Experimente in $CDCl_3$, DMSO und CD_3OH durchgeführt (Abb. 2.23).

Die TOCSY-Spektren von **16a** in polareren Lösungsmitteln ergaben zwar geringere Linienbreiten der Resonanzen, die Anzahl der in Lösung stabilen Konformere wurde aber auch erhöht, wie in Abb. 2.23c) zu erkennen ist. So konnten für die Verbindung **16a** ($n = 6$) in $CDCl_3$ insgesamt fünf, in $DMSO-d^6$ insgesamt vier und in CD_3OH insgesamt sieben Signalsätze zugeordnet werden. In unpolaren Lösungsmitteln wie $CDCl_3$ wird der Übergangszustand der cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung schneller durchlaufen [55] und man beobachtet deshalb durch Austausch zwischen den beiden

Konformeren verbreiterte Linien im NMR-Spektrum. Durch Verwendung von polareren Lösungsmitteln wie DMSO- d^6 und CD_3OH werden die in $CDCl_3$ auf der NMR-Zeitskala austauschenden Konformationen stabilisiert. Dies führt zu einer höheren Anzahl von Konformationen.

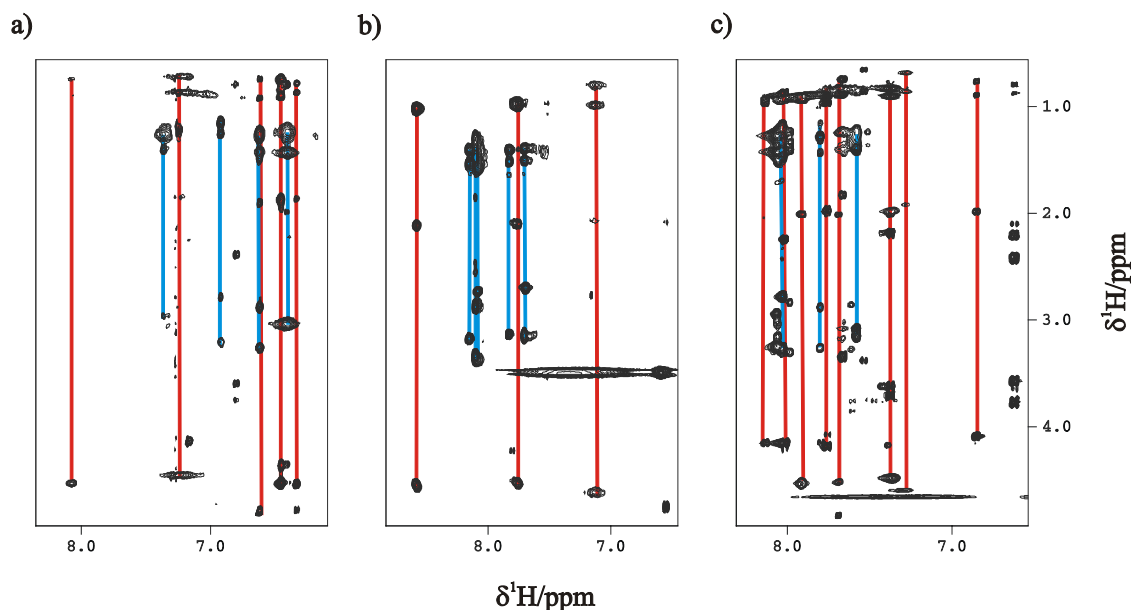


Abb. 2.23: H^N -Aliphaten-Bereich der TOCSY-Spektren des zyklischen Peptides **16a** ($n = 6$) in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, AMX400, 300 K, $\tau_m = 70$ ms, a) $CDCl_3$, b), $DMSO-d^6$, c) CD_3OH , rot: Signale des Valins, blau: Signale des aliphatischen Linkers.

Bei Erhöhung der Temperatur von 300 K auf 330 K bei **16a** in CD_3OH und von 300 K auf 370 K bei **16c** in $DMSO-d^6$ beobachtet man zwar die Koaleszenz einiger der H^N -Resonanzen im 1H -Spektrum, allerdings kann auch hier keine einzelne Konformation erhalten werden, die die Zuordnung der Resonanzen möglich machen würde und an der man die Stabilisierung des cis-Konformers der Dolastatin 10-Derivate überprüfen könnte.

Für die hohe Anzahl von Konformationen in Lösung dürften die fünf Peptidbindungen in den zyklischen Peptiden verantwortlich sein, welche durch die erhöhte Ringspannung ebenfalls stabile cis-trans-Isomere in Lösung ausbilden können. Um dieses Problem zu beseitigen wurde die Anzahl der Peptidbindungen in einem neuen Ansatz reduziert.

2.2.4 Synthese der zyklischen Dolastatin 10-Derivate Teil 2

Um die Anzahl der Peptidbindungen in den zyklischen Dolastatin 10-Derivaten von fünf auf drei zu erniedrigen, soll zum einen der Linker am Dolavain direkt als N-Alkylrest eingeführt und nicht über eine Peptidbindung verknüpft werden. Zum anderen soll am C-Terminus des Prolin eine Esterverknüpfung etabliert werden, die keine stabilen cis-trans-Isomere ausbilden kann. Daraus resultieren folgende Zielmoleküle:

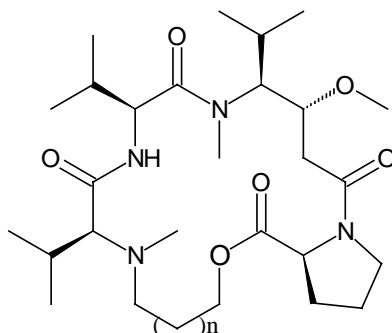


Abb. 2.24: Zyklische Dolastatin 10-Derivate; $n = 2, 4$

Die Linkerlänge für den verknüpfenden Aliphaten wurde durch Strukturrechnungen ohne experimentelle *restraints* mit dem Programm X-PLOR [56] ermittelt, welche von Dipl.-Chem. J. Meiler durchgeführt wurden. Für die Bildung von einem stabilen cis-Konformer an der Peptidbindung zwischen der Dolavain- und der Prolin-Einheit ergab sich eine Kettenlänge von vier Kohlenstoffatomen. Bei der Synthese der zyklischen Peptide wurde deshalb mit einer Kettenlänge von vier und sechs Kohlenstoffatomen gearbeitet.

Der Zyklisierungsschritt der Makrolactone sollte durch eine intramolekulare Veresterung durchgeführt werden, weil die Esterfunktionalität im Vergleich zu den Peptidbindungen labiler ist.

Bei der Synthese der zyklischen Lactone wurde zunächst angestrebt, das entsprechende N-alkylierte N-S-Methyl-Valin (Abb. 2.25) zu synthetisieren.

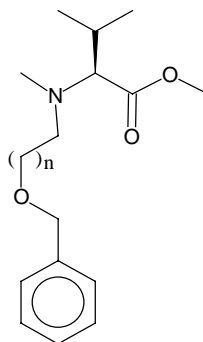


Abb. 2.25: Zielverbindung; $n = 3, 5$

Als C-terminale Schutzgruppe wurde ein Methylester und für die Hydroxygruppe ein Benzylether gewählt. Der deprotonierte Stickstoff des Valins sollte in der Lage sein, die entsprechende Abgangsgruppe (z.B. Br, Mesylat) im Linkermolekül nucleophil zu substituieren. Das allgemeine Reaktionsschema ist in Abb. 2.26 gezeigt.

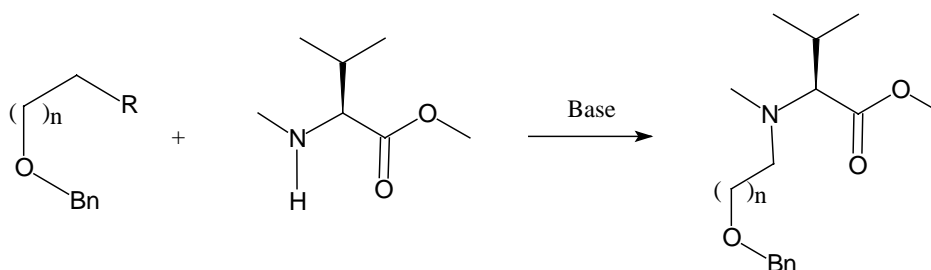


Abb. 2.26: Synthesevorschlag des N-alkylierten S-Valin-Derivates; $R = \text{Br, Mes}$, $n = 3, 5$

Für die Synthese des N-Methyl-S-Valinmethylester (Abb. 2.27) wurde zunächst Z-S-Valin **17** mit Thionylchlorid in Methanol in den entsprechenden Methylester **18** mit einer Ausbeute von 90 % umgesetzt [57].

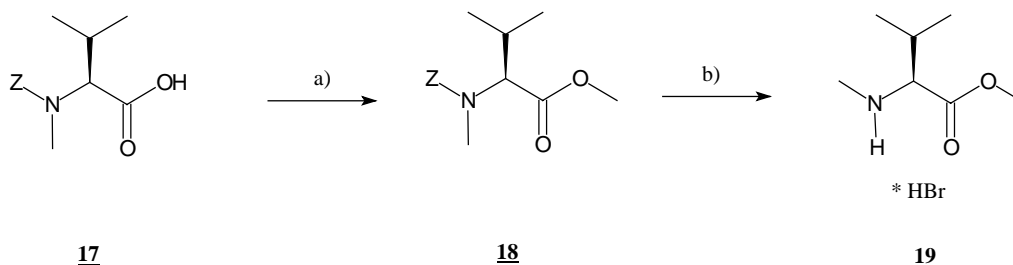


Abb. 2.27: Synthese des N-Methyl-S-Valinmethylester **19**; a) SOCl_2 , MeOH, $-5\text{ }^\circ\text{C}$ – reflux. 3 h, 90 %; b) HBr, AcOH, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, 99 %.

Die anschließende N-terminale Entschützung mit HBr in Eisessig zu **19** verlief mit einer Ausbeute von 99 %.

Bei der Synthese der monobenzylierten Alkandiole (Abb. 2.28) wurde zunächst eine thermodynamische Variante der Veretherung gewählt. Dabei wurden mit Kaliumcarbonat als Base die entsprechenden Alkandiole mit Benzylbromid in Acetonitril umgesetzt [58]. Neben dem gewünschten Produkt mit Ausbeuten von 48 - 79 % wurde auch die Bildung von dibenzylierten Diolen sowie von Benzylalkohol beobachtet. Letzterer bereitete bei der säulenchromatographischen Aufreinigung wegen des sehr ähnlichen Retentionsfaktors große Schwierigkeiten. Weil offenbar nach abgeschlossener Veretherung das entstehende Wasser in der Lage ist, das Benzylbromid zu Benzylalkohol zu zersetzen, wurde auf eine Vorschrift der Williamson-Veretherung zurückgegriffen, bei der kein Wasser entsteht [59].

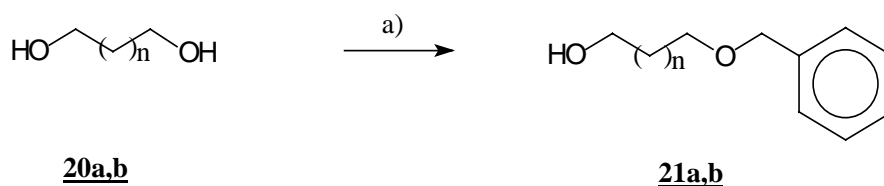


Abb. 2.28: Synthese der monobenzylierten 1, (n+2)-Alkandiole **21a,b**, $n = 2, 4$; a) Methode 1: Benzylbromid, K_2CO_3 , Acetonitril, reflux., 2 d, 48 - 79 %; Methode 2: Benzylbromid, NaH, THF, 0 °C - reflux., 2 d, 80 - 92 %.

Hierbei wurde als Base Natriumhydrid in Tetrahydrofuran verwendet, wobei die monobenzylierten Alkandiole **21a,b** mit einer Ausbeute von 80 - 92 % ohne Nebenprodukte entstanden.

Nach der Bildung des Mesylats **22** von 1-Benzyl-6-hexanol **21b** wurde es mit N-Methyl-S-Valinmethylester **19** in Gegenwart von Natriumhydrid als Base in DMF umgesetzt. Hierbei entstand leider nicht das gewünschte Produkt, sondern nur das Umesterungsprodukt **23** (Abb. 2.29).

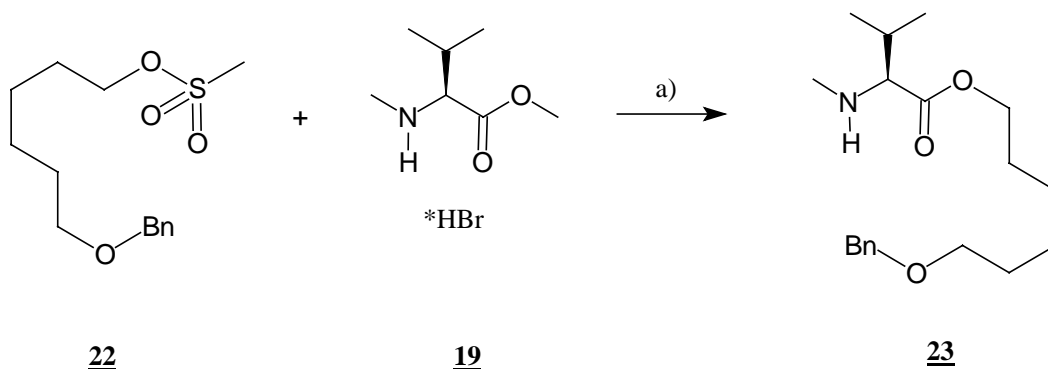


Abb. 2.29: Nebenreaktion bei der Alkylierung von N-Methyl-S-Valinmethylesters; a) NaH, DMF, 0 °C - RT, 24 h, 34 %

Die Konstitution von **23** wurde NMR-spektroskopisch unter Verwendung eines HMBC nachgewiesen (Abb. 2.30). Es werden hier ausgehend von der Carboxylgruppe des N-Methyl-S-Valin Kreuzsignale zum H_α , H_β und zu der nächsten Methylengruppe im Aliphaten beobachtet.

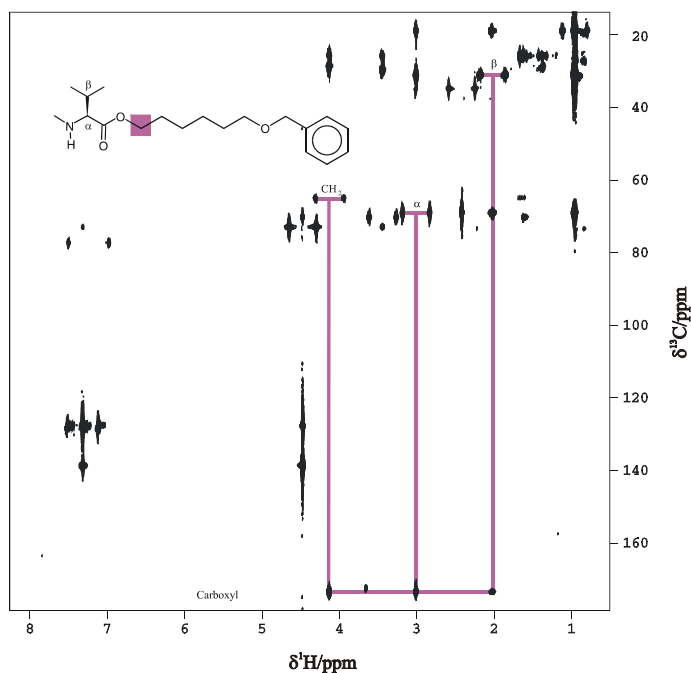


Abb. 2.30: HMBC des Umesterungsproduktes **23**; CDCl_3 , 300 K, AMX400

Auch die Verwendung von Kaliumcarbonat in Acetonitril ergab weder das gewünschte N-alkylierte Produkt noch das Umesterungsprodukt.

Weil diese Synthesemethode nicht zum Ziel führte, wurde auf die zweite Strategie mit Bromid als Abgangsgruppe zurückgegriffen. Hierfür wurden zunächst die entsprechen-

den Dibromalkane mit Benzylalkohol in Gegenwart von Natriumhydrid als Base umgesetzt (Abb. 2.31).

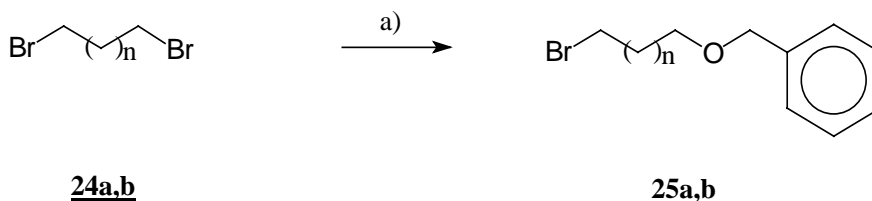


Abb. 2.31: Synthese der 1-Benzyloxy-(n+2)-bromalkane 25a,b, $n = 2, 4$; a) Benzylalkohol, NaH, THF, 0°C - reflux., 3 h, 75 - 91 %

Die Alkylierung des Stickstoffs des N-Methyl-S-Valinmethylesters 19 wurde durch Zugabe von katalytischen Mengen Kaliumiodid und Kaliumcarbonat als Base in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt (Abb. 2.32).

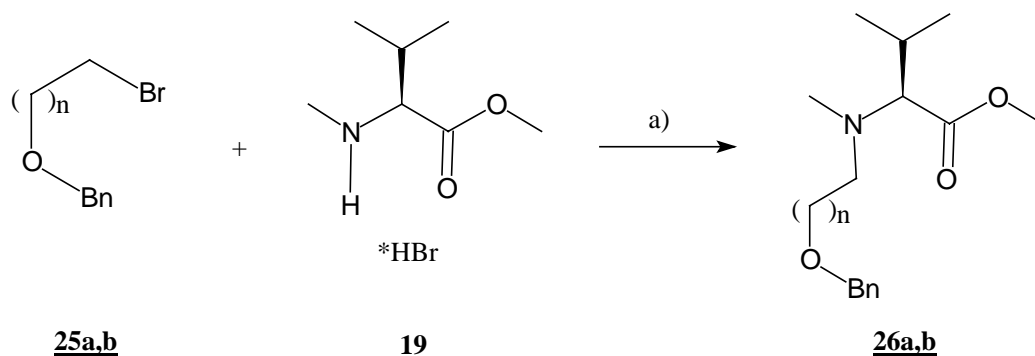


Abb. 2.32: Synthese der N-alkylierten N-Methyl-S-Valinmethylester 26a,b, $n = 3, 4, 5$; a) K_2CO_3 , KI, für $n = 3$ DMF und Acetonitril, für $n = 5$ Aceton, RT - reflux., 7 - 10 d, 22 - 34 %

Das für Finkelstein-Bedingungen charakteristische Lösungsmittel Aceton ergab nur eine Ausbeute von 34 %. Auch die Verwendung von Dimethylformamid und Acetonitril als Lösungsmittel führte nicht zu einer Erhöhung der Ausbeute. Im Falle von Dimethylformamid wurde auch 2 % von dem Umesterungsprodukt beobachtet.

Die Verseifung des Methylesters lieferte trotz Variation der Bedingungen nicht die gewünschte freie Carbonsäure (Abb. 2.33).

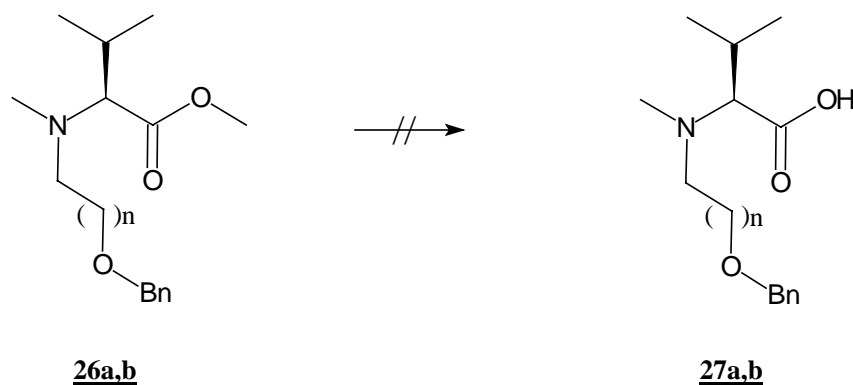


Abb. 2.33: Versuch der Verseifung von N-alkyliertem N-Methyl-S-Valinmethylester

Es wurde versucht, den Methylester mit 2 M Natronlauge in Dioxan und THF [57] bzw. mit 2 M LiOH in Methanol [60] abzuspalten. Trotz des Erwärmens zum Sieden konnte nach 10 Tagen nur ca. 5 % des Produktes im ^1H -NMR beobachtet werden. Wegen der hohen Racemisierungsneigung von N-alkylierten α -Aminosäuren und der basischen polaren Bedingungen der Reaktion schied diese Synthesestrategie aus.

Deshalb wurde nun die reduktive Alkylierung des N-terminal entschützten Tetrapeptides durch Natriumborhydrid durchgeführt. Die hierfür notwendigen Aldehyde wurden mithilfe der Swern-Oxidation [61] mit $\text{SO}_3\cdot\text{Pyridin}$ -Komplex als elektrophilem Aktivator aus den monobenzylierten Diolen erhalten (Abb. 2.34).

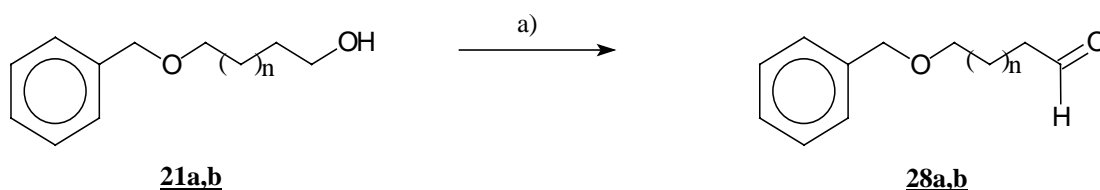


Abb. 2.34: Synthese der (n+3)-Benzyloxy-1-alkanale **28a,b**, $n = 1, 2, 3$; a) $\text{SO}_3\cdot\text{Pyridin}$, DMSO, TEA, CH_2Cl_2 , 0°C - RT, 3 h, 80 - 87 %.

Zunächst wurde die Reaktion an N-Methyl-S-Valinmethylester **19** durchgeführt, um die optimalen Reaktionsbedingungen für die Reaktion des Tetrapeptides zu finden. Zum einen muß man den Aldehyd im deutlichen Überschuß einsetzen, weil ein Großteil durch Natriumborhydrid zu dem entsprechenden Alkohol reduziert werden würde und zum anderen mußte man bei einem definierten pH-Wert arbeiten, weil die Amino-

verbindung als Hydrobromid vorliegt. Deshalb wurde die Reaktionslösung mit Triethylamin/Trifluoressigsäure auf pH 6 eingestellt und der Aldehyd im vierfachen Überschuß eingesetzt [62].

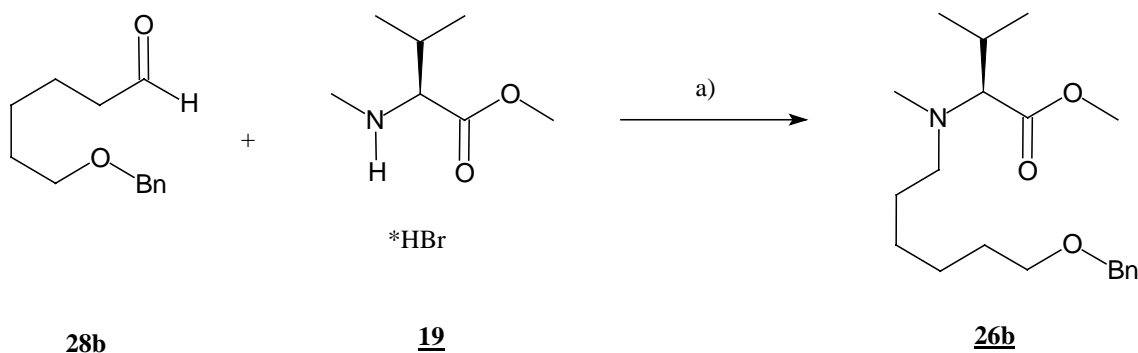


Abb. 2.35: Synthese des N-alkylierten N-Methyl-S-Valinester **26b**; a) NaBH_4 , TEA/TFA, pH 6, MeOH, 0°C - RT, 18 h, 96 %

Man erhielt den N-alkylierten N-Methyl-S-Valinmethylester **26b** mit einer Ausbeute von 96 % (Abb. 2.35).

Bei der reduktiven Alkylierung des Tetrapeptides wurde auf das Puffersystem verzichtet, weil das eingesetzte Amin nicht als Hydrobromid vorlag. Die gewünschten N-alkylierten Tetrapeptide wurden bei der Reaktion in Gegenwart von vier Äquivalenten des entsprechenden Aldehyds und Natriumborhydrid mit einer Ausbeute von 19 - 46 % hergestellt (Abb. 2.36).

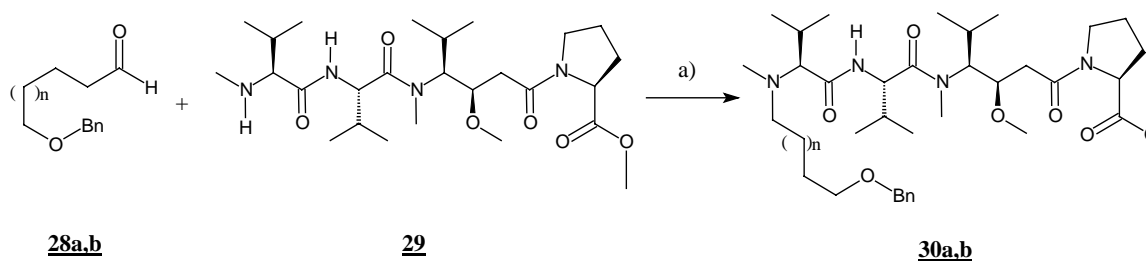


Abb. 2.36: Reduktive Alkylierung des Tetrapeptids **29**, $n = 1, 3$; a) NaBH_4 , MeOH, 0°C - RT, 18 h, 19 - 46 %

Die Entschützung des Methylesters am C-Terminus des Vorläufers der zyklischen Peptide mit 2 molarer Natronlauge verlief nicht quantitativ. Nach der hydrogenolytischen Abspaltung des Benzylethers am aliphatischen Linker mit $\text{H}_2/\text{Pd/C}$ in Eisessig wurden

nach der HPLC-Aufreinigung immer noch 30 % des vollgeschützten Peptides und 27 % des entsprechenden Methylesters von **32b** gefunden. Auch konnte das voll entschützte Produkt schon bei der Verseifung beobachtet werden, welches durch einen nucleophilen Angriff des Hydroxidions am Benzylkohlenstoff der Schutzgruppe entstanden sein dürfte (Abb. 2.37).

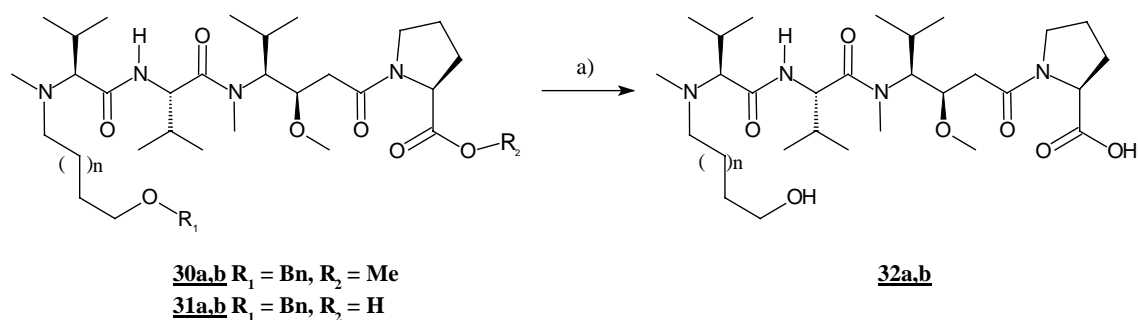


Abb. 2.37: Entschützung von **32a,b**, $n = 1, 3$; a) i. 2 M NaOH, Dioxan, RT, 18 h, 20 – 89 %, ii. HBr/AcOH, RT, 6 h oder H_2 , Pd/C, AcOH, RT, 5 h, 20 – 42 %

Deshalb wurde die vollständige Entschützung ohne Aufreinigung zwischen den beiden Reaktionen durchgeführt und der Benzylether mit HBr in Eisessig entfernt. Allerdings wurden auch hier die eingesetzten Produkte beobachtet.

Die Macrolactonisierung von **32a,b** sollte nach der Methode von Yamaguchi [63] durchgeführt werden. Für relativ unpolare Verbindungen werden meist aromatische Lösungsmittel wie Xylol, Toluol etc. verwendet, die es ermöglichen, das anfallende Triethylammoniumchlorid durch Filtration abzutrennen. Bei den vorliegenden Dolastatin 10-Derivaten wäre Methylenchlorid als Lösungsmittel am besten geeignet, allerdings kann man das Triethylammoniumchlorid wegen seiner relativ guten Löslichkeit in Methylenchlorid nicht entfernen. Deshalb wurden die Reaktionsbedingungen an der Modellverbindung 16-Hydroxyhexadecansäure **33** ohne Abtrennen des Triethylammoniumchlorid durch Filtration getestet. Die langkettige Hydroxycarbonsäure wurde in Gegenwart von Triethylamin in Methylenchlorid mit 2,4,6-Trichlorbenzoe-

säurechlorid versetzt und mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie auf die Bildung des gemischten Anhydrids überprüft.

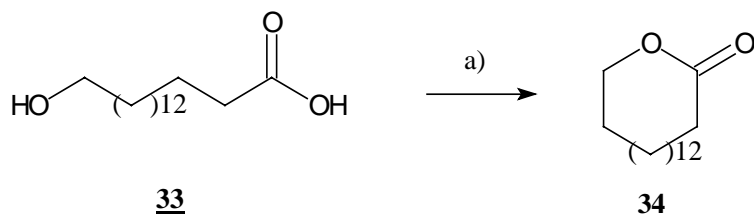


Abb. 2.38: Macrolactonisierung von 16-Hydroxyhexadecansäure **33** nach Yamaguchi [63]; a) i. 2,4,6-Trichlorbenzoesäurechlorid, TEA, CH_2Cl_2 , RT, 18 h; ii. CH_2Cl_2 , DMAP, RT, 2 h, 96 %

Anschließend wurde die Lösung auf 2 mM verdünnt und mit 4-Dimethylaminopyridin versetzt. Das gewünschte Lacton **34** konnte mit einer Ausbeute von 96 % erhalten werden (Abb. 2.38).

Die Macrolactonisierung von **32a,b** wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei der Synthese von **34** durchgeführt. Die Macrolactone **35a,b** wurden mit Ausbeuten von 15 - 34 % mit zunehmender Kettenlänge bezogen auf **32a,b** erhalten.

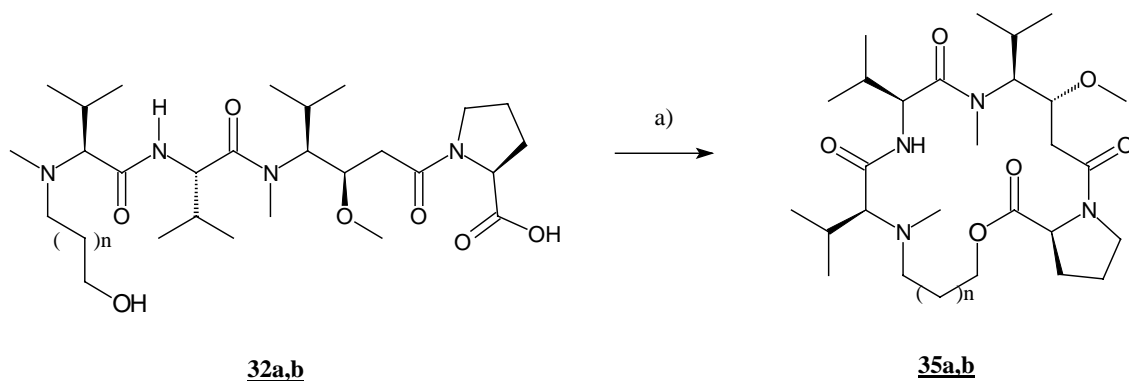


Abb. 2.39: Macrolactonisierung von **32a,b** nach Yamaguchi [63], $n = 2, 4$; a) i. 2,4,6-Trichlorbenzoesäurechlorid, TEA, CH_2Cl_2 , RT, 18 h; ii. CH_2Cl_2 , DMAP, RT, 2 h, 15 - 35 %

Bei der Zyklisierung wurde die Bildung von Dimeren und Trimeren in einem hohen Ausmaß (30 - 40 %) beobachtet, welche sich auch nicht durch weitere Verdünnung verringern ließ.

2.2.5 NMR-spektroskopische Untersuchung der zyklischen Peptide Teil 2

Die beiden zyklischen Dolastatin 10-Derivate **35a,b** wurden NMR-spektroskopisch mithilfe von homonuclearen zweidimensionalen Experimenten in CD_2Cl_2 und H_2O untersucht. Sie liegen in den Lösungsmitteln jeweils nur in einer Konformation vor, so daß hier eine Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebung in H_2O mit dem Programm Felix (MSI, San Diego) aus den DQF-COSY- und den TOCSY-Spektren mit 70 ms Mischzeit möglich war. Das ROESY-Spektrum mit einer Mischzeit von 300 ms konnte für die Gewinnung der Abstandsinformation herangezogen werden. In Abb. 2.40 ist ein Ausschnitt des ROESY-Spektrums von **35a** mit den zugeordneten ROEs gezeigt.

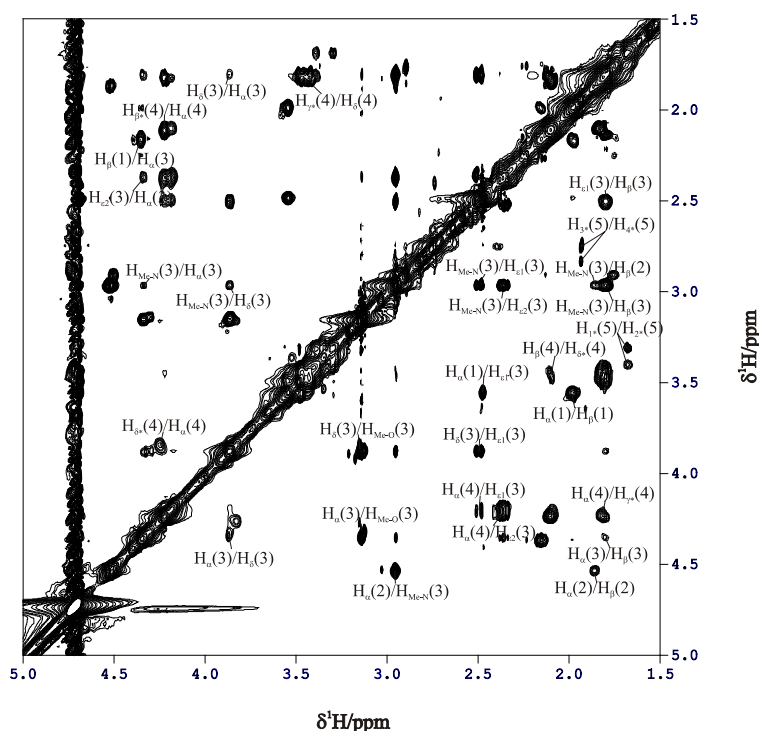


Abb. 2.40: Bereich des ROESYs von **35a**, DRX600, H₂O, 10 % D₂O, 290 K. Es sind alle Zuordnungen der ROEs eingezeichnet.

Insgesamt wurden 78 ROEs für **35a** zugeordnet. Diese teilen sich in 65 intraresiduale, elf sequentielle und zwei mittelreichweitige ROEs auf. Nach Integration der Signale konnten Abstandsinformationen ermittelt werden, mit denen 100 Strukturen mit dem Programm X-PLOR, Version 98.1, [56] berechnet wurden. Hierbei wurde die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindungen zugelassen. Es traten keine Verletzungen der

ROE > 0.25 Å auf. In den zehn energieärmsten Strukturen befindet sich die Peptidbindung zwischen der Dolavain-Einheit und dem Prolin in der cis-Konformation, die beiden verbleibenden Peptidbindungen liegen in der trans-Konformation vor. In Abb. 2.41 ist die energieärmste Struktur von **35a** gezeigt.

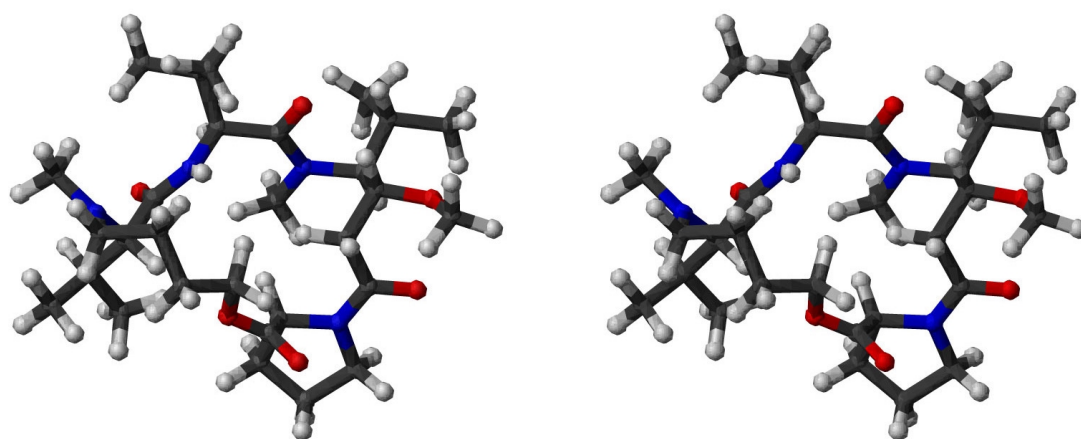


Abb. 2.41: Energieärmste Struktur von **35a** (Stereodarstellung).

Beim Vergleich der Struktur von **35a** mit der Struktur des cis-Konformers von Dolastatin 10 beobachtet man eine gute Übereinstimmung der Dolavain-Einheit und des Prolins in **35a** mit den entsprechenden Regionen (Dolaisoleuin und dem Prolin-Ring im Dolaproin) im Dolastatin 10, welche für die Bindung an das Tubulin verantwortlich sind (Tabelle 2.1). Bei dem zyklischen Peptid **35a** ist allerdings in der Valin-Einheit bezüglich des Dihedralwinkels der Bindung zwischen dem Carboxyl-Kohlenstoffatoms und dem C $_{\alpha}$ -Atoms in dieser Region um 60 ° verschieden, welches durch die erhöhte Ringspannung im zyklischen Peptid **35a** zu erklären ist.

Tabelle 2.1: Vergleich der Rückgratwinkel von **35a** mit denen des cis-Konformers von Dolastatin 10. Die Winkel in der unnatürlichen Aminosäure Dolavain in **35a** und dem Dolaisoleuin im Dolastatin 10 sind mit α , β , γ und δ vom N- zum C-Terminus bezeichnet (Abb. 2.42).

Rest	Winkel	cis-Konformer von Dolastatin 10	35a
Dov	ψ	89.8	166.2
	ω	-179.0	180.0
Val	ϕ	-79.1	-130.2
	ψ	125.0	-175.2
	ω	-175.5	179.8
Dil/Dav	α	-101.0	-60.6
	β	-73.1	-54.1
	γ	65.3	70.8
	δ	-131.4	-139.6
	ω	-0.2	0.3
Dap/Pro	ϕ	-76.6	-70.9
	ψ	169.6	153.3

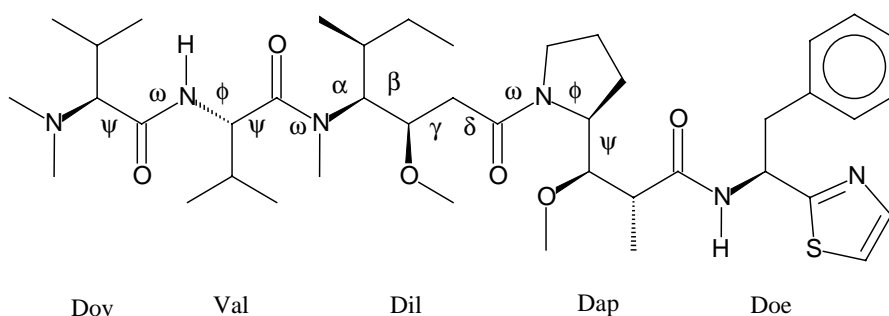


Abb. 2.42: Nomenklatur der Dihedralwinkel in Dolastatin 10. Die Winkel in der unnatürlichen Aminosäure Dolaisoleuin im Dolastatin 10 sind mit α , β , γ und δ vom N- zum C-Terminus bezeichnet.

Die Verbindung **35b** wurde analog zu **35a** bezüglich ihrer Konformation in H₂O untersucht. Aus dem ROESY-Spektrum (Abb. 2.43) wurden insgesamt 59 ROEs zugeordnet, welche sich in 49 intraresiduale, acht sequentielle und zwei mittlere Reichweite ROEs aufteilen.

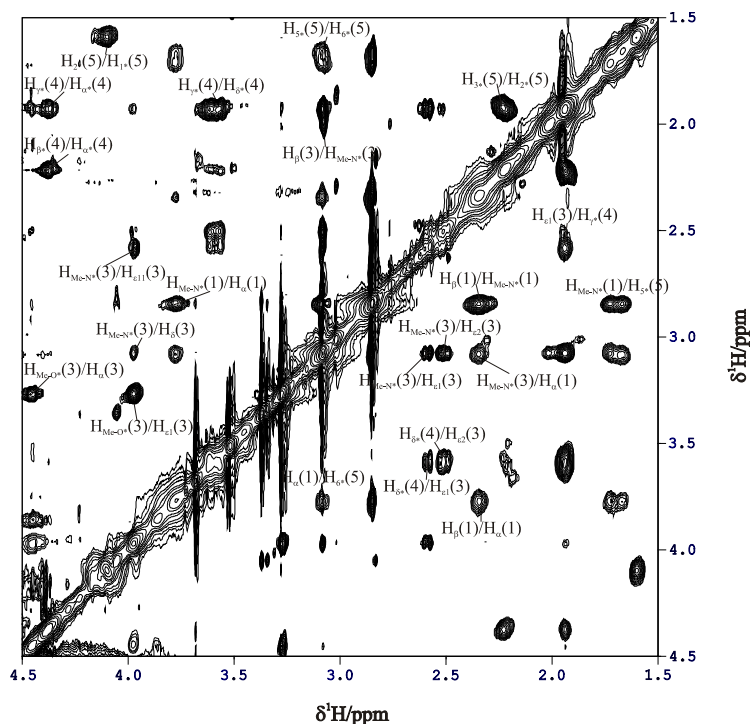


Abb. 2.43: Bereich des ROESYs von **35b**, DRX600, H₂O, 10 % D₂O, 290 K. Es sind Zuordnungen der ROEs eingezeichnet.

Nach der Strukturrechnung wurde in den zehn energieärmsten Strukturen, welche ebenfalls keine Verletzungen der ROE $> 0.25 \text{ \AA}$ aufwiesen, aus 100 berechneten Strukturen ausschließlich die trans-Konformation für die drei Peptidbindungen in **35b** gefunden. Die energieärmste Struktur von **35b** ist in Abb. 2.44 gezeigt.

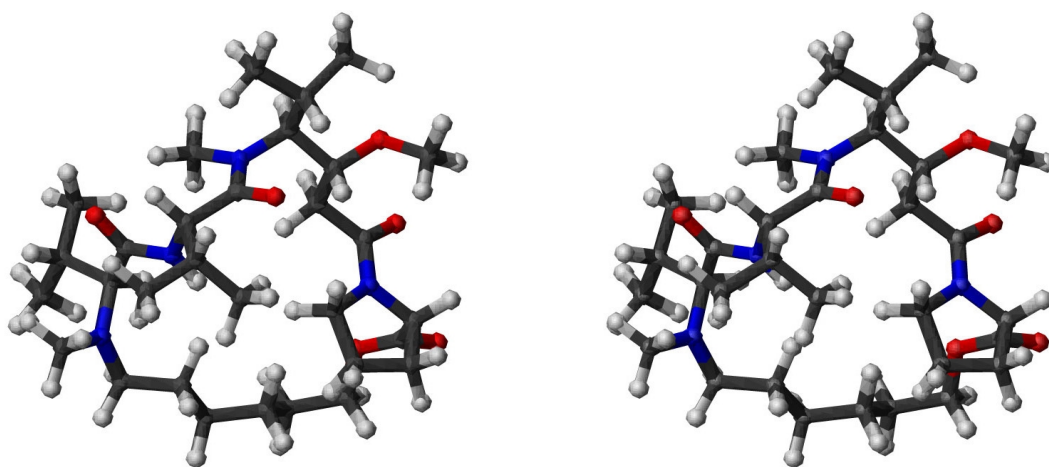


Abb. 2.44: Energieärmste Struktur von **35b**.

In der Struktur von **35b** und der Struktur des trans-Konformers von Dolastatin 10 sind die Seitenketten der ersten drei N-terminalen Einheiten (Dolavalin, Valin und Dola-

isoleuin) im Dolastatin 10 ähnlich der Seitenketten der entsprechenden Regionen im zyklischen Peptid **35b** angeordnet. Geringe Abweichungen sind im Peptidrückgrat zu beobachten (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Vergleich der Rückgratwinkel von **35b** mit denen des trans-Konformers von Dolastatin 10. Die Winkel in der unnatürlichen Aminosäure Dolavain im **35b** und dem Dolaisoleuin im Dolastatin 10 sind mit α , β , γ und δ vom N- zum C-Terminus bezeichnet (Abb. 2.42).

Rest	Winkel	trans-Konformer von Dolastatin 10	35b
Dov	ψ	122.8	72.1
	ω	-179.0	179.8
Val	ϕ	-153.0	-121.2
	ψ	71.7	56.1
	ω	179.9	-179.9
Dil/Dav	α	95.3	64.2
	β	70.1	55.5
	γ	161.2	175.3
	δ	74.4	91.4
	ω	179.5	180.0
Dap/Pro	ϕ	-77.9	-71.1
	ψ	166.1	-37.5

Die Strukturen der beiden zyklischen Dolastatin 10-Derivate **35a,b** repräsentieren somit das cis-Konformer im Falle des kürzeren Linkers (**35a**) und das trans-Konformer im Falle des längeren Linkers (**35b**) von Dolastatin 10.

2.2.6 Synthese des linearen Dolastatin 10-Derivates

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen in Gegenwart von Tubulin sollte ein ^{15}N -markiertes lineares Dolastatin 10-Derivat eingesetzt werden. Die entsprechende unmarkierte Verbindung **41** sollte bei den Tubulin-Polymerisationsstudien eingesetzt werden.

Für die Synthese des linearen Dolastatin 10-Derivates (Abb. 2.45) wurde das Dipeptid **6** C-terminal mit TFA entschützt und mit S-Prolinmethylester zu dem Tripeptid **37** unter Aktivierung von PPA gekuppelt. Durch Verseifung des Methylesters und anschließen-

der Reaktion von **38** mit Isopentylamin in Gegenwart von PPA erhielt man **39** mit einer Ausbeute von 90 %. Nach der anschließenden katalytischen Hydrierung wurde **40** mit *S*-*N,N*-Dimethylvalin in Gegenwart von PPA zu dem Pentapeptid **41** mit einer Ausbeute von 55 % umgesetzt.

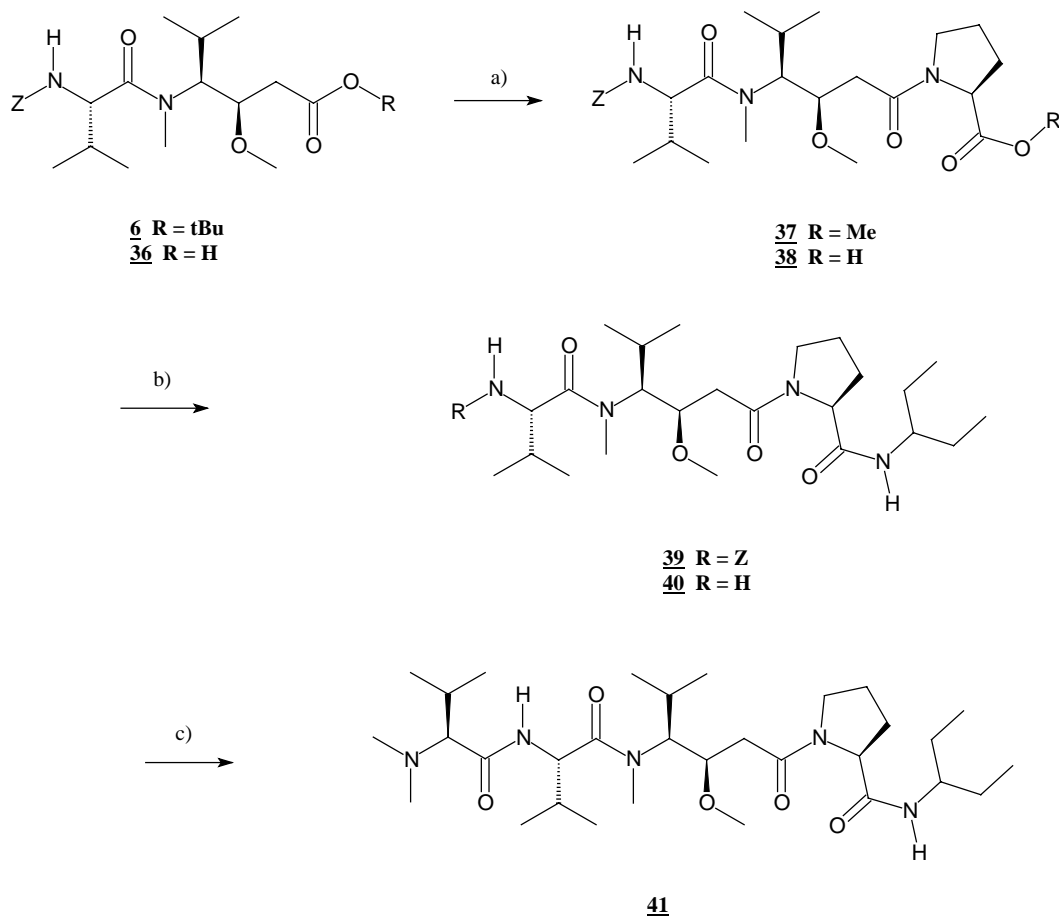


Abb. 2.45: Synthese des linearen Dolastatin 10-Derivates **41**: a) i. TFA, CH_2Cl_2 , 25 °C, 18 h, 93 %, ii. *S*-Prolinmethylester, PPA, DIEA, CH_2Cl_2 , 0 °C, 24 h, 90 %, b) i. NaOH, Dioxan, 25 °C, 24 h, 97 %, ii. Isopentylamin, PPA, DIEA, CH_2Cl_2 , 0 °C, 24 h, 70 %, b) i. Pd/C, H_2 , MeOH, 25 °C, 1 h, 50 %, ii. *S*-*N,N*-Dimethylvalin, PPA, DIEA, CH_2Cl_2 , 0 °C, 24 h, 55 %

Die entsprechende im Isopentylamin ^{15}N -markierte Verbindung wurde von Dr. D. Belik für die NMR-spektroskopischen Bindungsstudien in Gegenwart von Tubulin zur Verfügung gestellt.

2.2.7 Synthese von ^{13}C -teilmarkiertem Colchicin

Das Colchicin sollte in der *N*-Acetylgruppe mit ^{13}C -isotopenmarkiert werden, um die Bindung des Colchicins an Tubulin NMR-spektroskopisch verfolgen und um die expe-

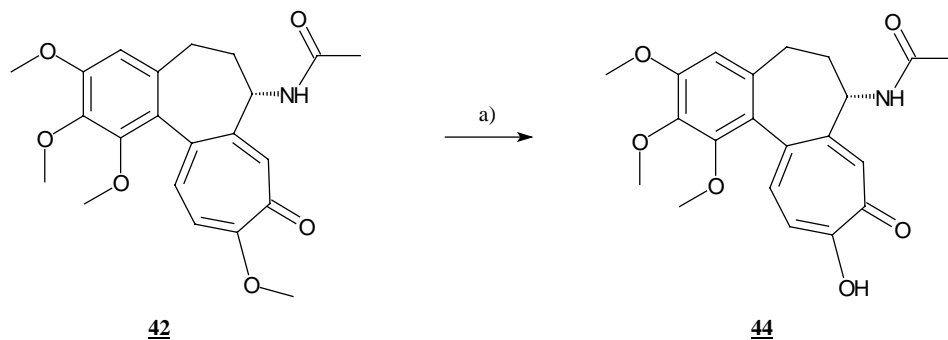


Abb. 2.47: Reaktion zu Colchicein **44**: a) K_2CO_3 , Aceton, H_2O , $60\text{ }^\circ C$, 2 h, 88 %

Für die Synthese von deacetyliertem Colchicin (Abb. 2.48) wurde gemäß den Arbeiten von Ducray *et al.* [66] der Stickstoff mit der Boc-Schutzgruppe versehen, um die Elektrophilie des Carboxylkohlenstoffs im Vergleich zum Tropolon-Ring zu erhöhen.

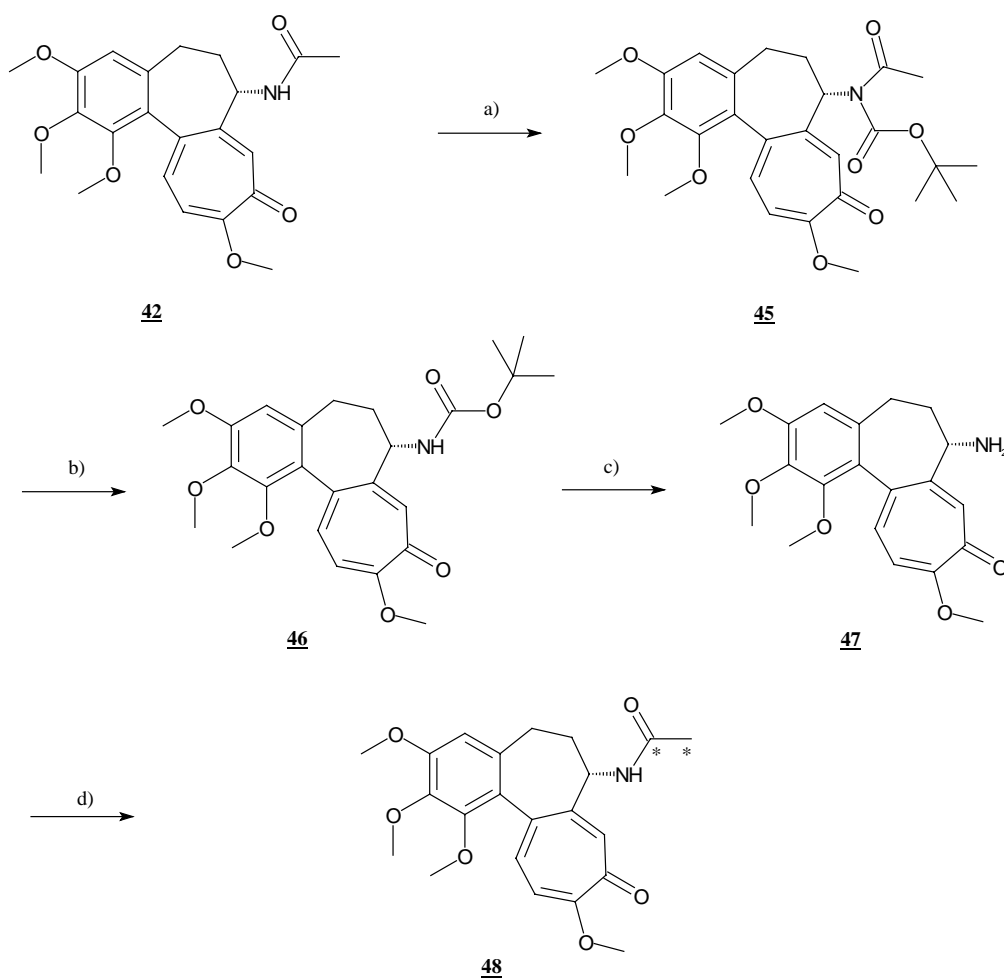


Abb. 2.48: Synthese von ^{13}C -markiertem Colchicin **48**: a) Boc_2O , DIEA, DMAP, CH_2Cl_2 , RT, 3 d, 40 %, b) NaOMe, MeOH, $0\text{ }^\circ C$, 24 h, c) TFA, CH_2Cl_2 , RT, 24 h, 64 % bez. auf **45**, d) ^{13}C -Ac $_2$ O, Pyridin, RT, 3 h, 83 %. Die Sternchen in **48** geben die Stelle der ^{13}C -Kerne an.

Bei der Reaktion von Colchicin mit Boc_2O in Gegenwart von DMAP und DIEA wurde **45** hergestellt. Die Ausbeute von 40 % konnte trotz weiterer Zugabe von Boc_2O nicht gesteigert werden. Bei der anschließenden Reaktion von **45** mit Natriummethanolat wurde ausschließlich das gewünschte Produkt **46** erhalten. Der unerwünschte Colchiceinsäuremethylether, welcher bei höheren Temperaturen entsteht [64], wurde nicht beobachtet. Nach der Umsetzung von **46** mit TFA wurde Deacetylcolchicin **47** mit einer Ausbeute von 64 % bezogen auf **45** gewonnen.

Die abschließende Reaktion mit ^{13}C -Essigsäureanhydrid in Pyridin lieferte mit einer Ausbeute von 83 % das isotopenmarkierte Colchicin **48**.

2.2.8 Isolierung von Tubulin aus Schweinehirn

Für die Tubulinpolymerisationsstudien und NMR-spektroskopischen Bindungsstudien der Dolastatin 10-Derivate und Colchicin wurde Tubulin aus Schweinehirnen nach einer modifizierten Anleitung von Williams und Lee [67] isoliert. Man nutzt die Fähigkeit des Tubulins aus, auch *in-vitro* durch Zugabe von GTP und Glycerin bei 37 °C zu polymerisieren und bei 4 °C anschließend zu depolymerisieren. Für die Abtrennung der MAPs kann das Tubulin über eine Anionenaustauschersäule weiter aufgereinigt werden. Das Schema der Tubulin-Isolierung aus Schweinehirn ist in Abb. 2.49 gezeigt.

Nach Homogenisierung der Schweinehirne in 100 mM Mes (pH 6.9), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 und 0.8 mM GTP wurde die Tubulin-Lösung durch Zentrifugation bei 4 °C von festen Zellbestandteilen abgetrennt. Anschließend wurde durch Zugabe von 1.5 mM GTP und 4 M Glycerin die Polymerisation bei 37 °C induziert. Durch Ultrazentrifugation wurden lösliche nicht an der Polymerisation beteiligte Proteine von den Microtubuli entfernt. Die Pellets wurden in dem oben beschriebenen Puffersystem plus 1.6 mM GTP aufgenommen und auf 4 °C abgekühlt. Nicht mehr aktives Tubulin oder

Mikrotubuli wurden wiederum durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Die daraus resultierende Tubulin-Lösung wird im folgenden als *mono-cycled* Tubulin bezeichnet.

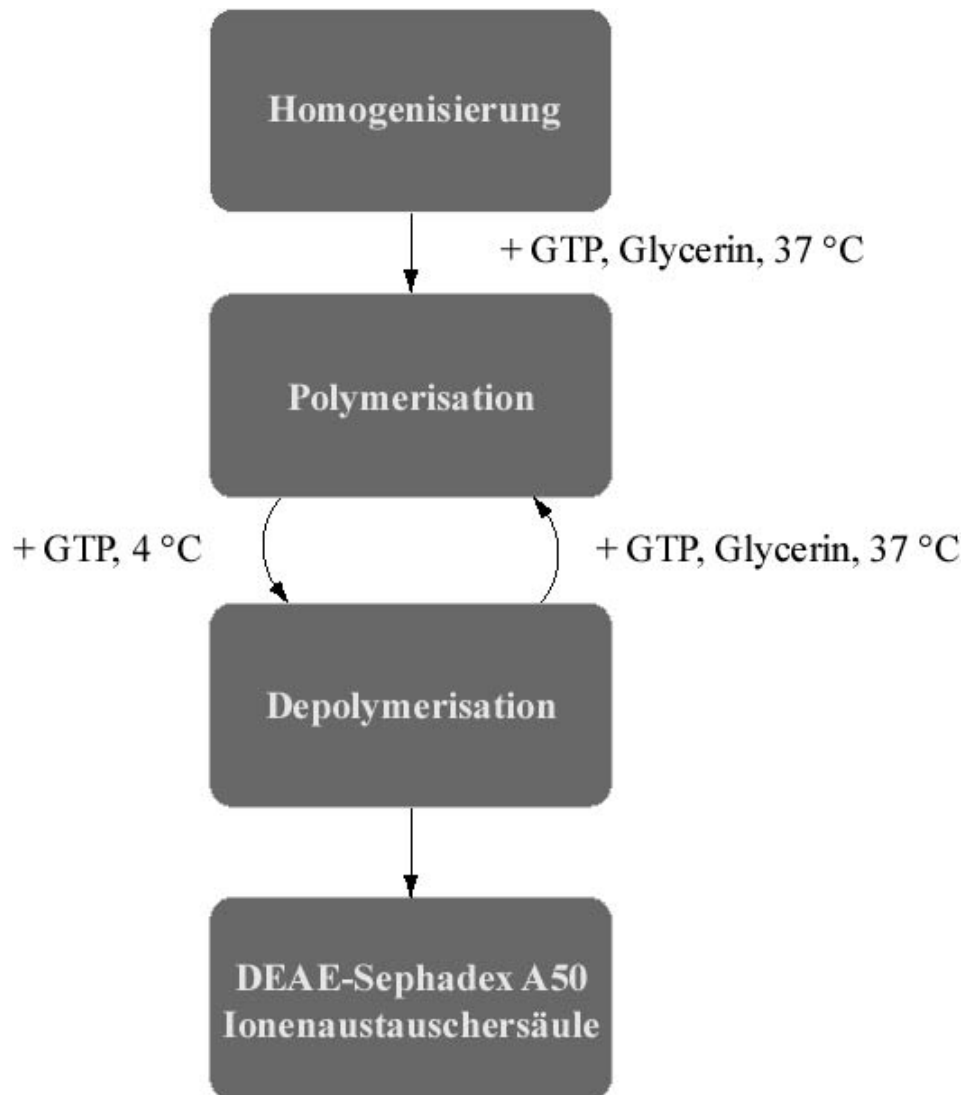


Abb. 2.49: Schema der Isolierung und Aufreinigung von Tubulin aus Schweinehirn

Dieser Vorgang kann angefangen bei der Polymerisation noch einmal wiederholt werden. Man gelangt dann zum sogenannten *twice-cycled* Tubulin. Dadurch konnte zwar Tubulin in der Lösung aufkonzentriert werden, aber die Abtrennung von den an der Polymerisation beteiligten MAPs und dem nur im neuronalen Gewebe vorkommenden τ -Protein kann hierdurch nicht erreicht werden.

Im SDS-Polyacrylamidgel in Abb. 2.50 kann man die Isolierung von Tubulin verfolgen. In der Bahn 2, welche dem Überstand nach der Homogenisierung des Schweinehirns

entspricht, sieht man das Verhältnis von Tubulin zu den restlichen Proteinen. Durch die beschriebene Aufreinigung kann Tubulin in den resultierenden Lösungen (Bahn 5 und 8) angereichert werden. Die Gesamtproteinkonzentration der Tubulin-Lösungen wurde nach Bradford [68] bestimmt und variierte im Bereich von 15 bis 25 mg/ml.

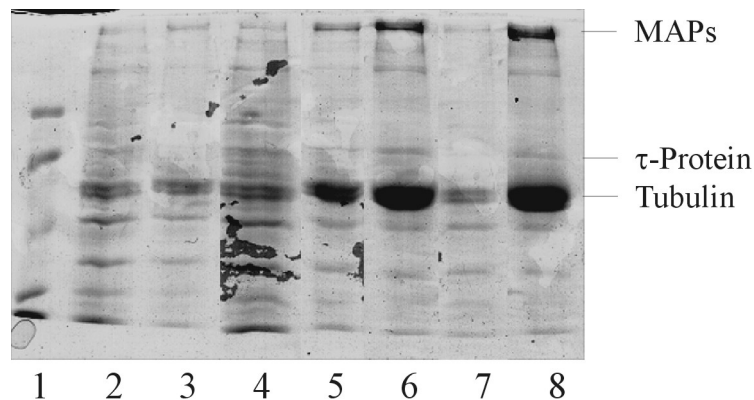


Abb. 2.50: SDS-Polyacrylamidgel (9%) der Isolierung von Tubulin aus Schweinehirn; Bahn 1: Marker, Bahn 2: 1 µl Überstand nach Homogenisierung, Bahn 3: 1 µl Überstand nach erster Polymerisation, Bahn 4: 1 µl Pellet nach erster Polymerisation, Bahn 5: 1 µl Tubulin-Lösung (mono-cycled Tubulin) nach erster Depolymerisation, Bahn 6: 1 µl Pellet nach zweiter Polymerisation, Bahn 7: 1 µl Überstand nach zweiter Polymerisation, Bahn 8: 1 µl Tubulin-Lösung (twice-cycled Tubulin) nach zweiter Depolymerisation

Die Qualität des erhaltenen Tubulins hängt sehr stark davon ab, wieviel Zeit seit der Schlachtung der Schweine bis zur Lagerung des Hirns auf Eis vergangen ist. Aus dem Hirn eines am Tag davor geschlachteten Rindes konnte kein polymerisationsfähiges Tubulin erhalten werden.

Die Polymerisation von Tubulin kann photometrisch bei 355 nm durch die Zunahme der Trübheit der Lösung in Abhängigkeit von der Zeit bei 25 °C verfolgt werden [69].

An dem Verlauf der Polymerisationskurven in Abb. 2.51 kann man erkennen, daß im Falle des *twice-cycled* Tubulin die Tubulin-Konzentration in der Lösung größer ist als im Falle des *mono-cycled* Tubulin.

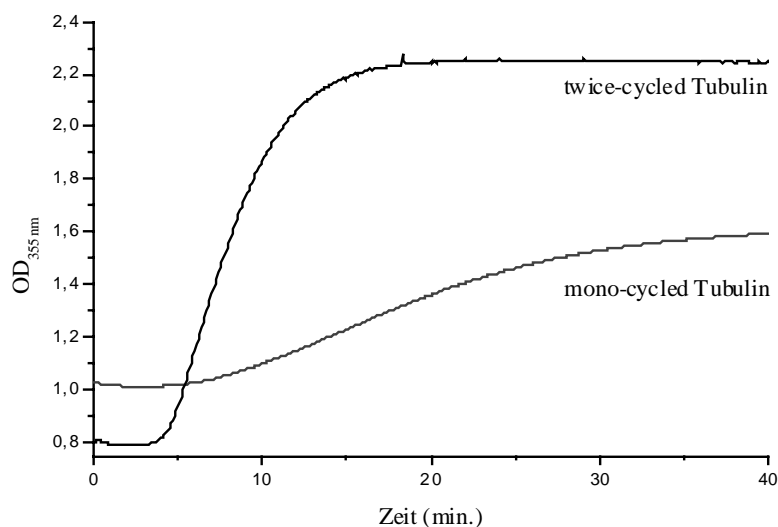


Abb. 2.51: Vergleich der Polymerisation von *mono-* und *twice-cycled* Tubulin bei 25 °C, 100 mM Mes (pH 6.9), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ und 1.6 mM GTP

Dadurch können sich die Protofilamente schneller bilden und die Polymerisation kann beginnen. Die Werte der optischen Dichten zum Zeitpunkt 0 spiegeln die Gesamtproteinmenge wieder. Beim *mono-cycled* Tubulin befinden sich, wie auch im SDS-Polyacrylamidgel in Abb. 2.50 Bahn 5 zu erkennen ist, noch ein größerer Anteil weiterer Proteine in der Lösung, welches sich in einem höheren Anfangswert bemerkbar macht.

Für die Polymerisationsstudien in Gegenwart von Dolastatin 10-Derivaten wurde *mono-cycled* Tubulin verwendet. Auf dieser Stufe hat man polymerisationsfähiges Tubulin in größeren Mengen als im Vergleich zu *twice-cycled* Tubulin. Durch Zugabe von 1 mM GTP kann die Polymerisation zu Microtubuli induziert werden.

Für die NMR-spektroskopischen Bindungsstudien des ¹⁵N-markiertem Dolastatin 10-Derivates und ¹³C-markiertem Colchicin sorgen die weiteren in der Lösung vorhandenen Proteine für meßtechnische Probleme. Durch die hohe Viskosität der *twice-cycled* Tubulin-Lösung konnte keine homogene NMR-Probe erhalten werden. Deshalb wurde das für die NMR-Spektroskopie verwendete Tubulin zum einen einem dritten Polymeri-

sations-/Depolymerisations-Schritt unterzogen. Dieses Tubulin wird im folgenden als „MAP-Tubulin“ bezeichnet, weil es noch MAPs enthält.

Zum anderen wurde das *mono-cycled* Tubulin über eine Anionenaustauschersäule (DEAE Sephadex A50) weiter aufgereinigt [70]. Tubulin besitzt einen pI-Wert von ca. 5.5, während die MAPs und die restlichen Proteine eher neutral sind und deshalb zu Beginn des Salzgradienten zwischen 25 und 250 mM NaCl von der Säule gespült werden (Abb. 2.52).

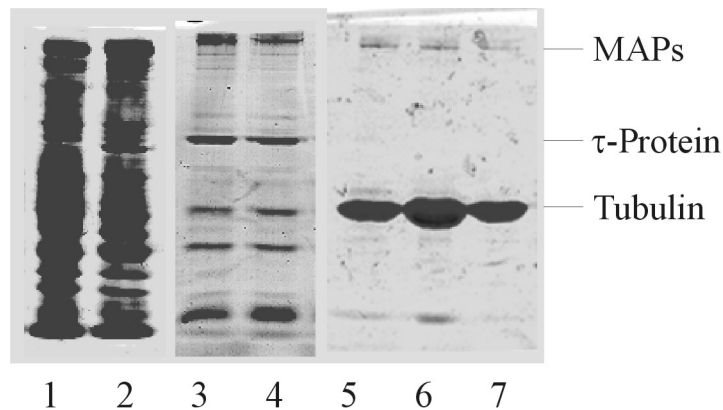


Abb. 2.52: SDS-Polyacrylamidgel (9%) der Aufreinigung von Tubulin mit DEAE Sephadex A50-Säule; 100 mM Pipes (pH 6.9), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM GTP, Bahn 1 und 2: 25 mM NaCl, Bahn 3 und 4: 250 mM NaCl, Bahn 5, 6 und 7: Tubulin-Fractionen bei 500 mM NaCl

Die Tubulin-Fractionen werden bei 500 mM NaCl eluiert und können anschließend mit Ultrafiltration durch eine semipermeable Membran mit Ausschlußmolmasse von 100 kDa in der Amicon-Zelle entsalzt, aufkonzentriert und auf den gewünschten Puffer eingestellt werden [71]. Dieses Tubulin wird im folgenden als „DEAE-Tubulin“ bezeichnet.

2.2.9 Polymerisationsstudien von Tubulin in Gegenwart von Inhibitoren

Die Polymerisationsstudien von Tubulin in Gegenwart von Dolastatin 10-Derivaten und Colchicin wurden an *mono-cycled* Tubulin durchgeführt. Die zu untersuchende Verbindung wurde in der gewünschten Konzentration in DMSO gelöst, bei 4 °C mit der

Tubulin-Lösung versetzt und zehn bis fünfzehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 mM GTP wurde die Zunahme der Trübheit der Lösung bei 355 nm und 25 °C photometrisch über 60 Minuten verfolgt [69]. Als Vergleich diente die Polymerisationskurve des *mono-cycled* Tubulins ohne Inhibitor unter den gleichen Bedingungen, welche am selben Tag aufgenommen wurde.

Zunächst wurde eine Polymerisationsstudie in Gegenwart von Colchicin im Bereich von 10 bis 100 µM durchgeführt. In Abb. 2.53 ist die Inhibition der Tubulin-Polymerisation durch Colchicin gezeigt. Der leicht negative Wert der optischen Dichte kurz nach Beginn der Messung ist auf kleine Luftbläschen in der Lösung zurückzuführen, welche beim Einfüllen der Protein-Lösung in die Küvette entstehen.

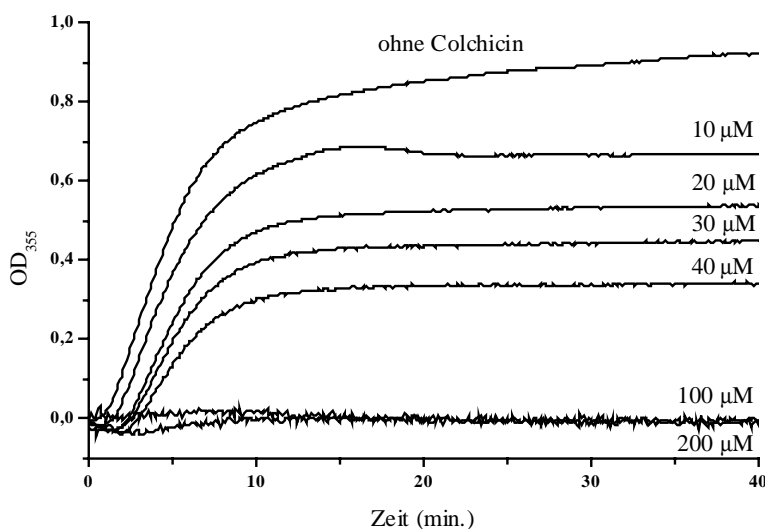


Abb. 2.53: Inhibition der Tubulin-Polymerisation durch Colchicin bei 25 °C, 100 mM Mes (pH 6.9), 5 % DMSO, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ und 1 mM GTP.

In Abb. 2.53 ist die konzentrationsabhängige Inhibition der Tubulin-Polymerisation durch Colchicin gezeigt. Der IC₅₀-Wert der Tubulin-Polymerisation für Colchicin beträgt ca. 30 µM, welcher von dem IC₅₀-Wert von 10 µM beschrieben von Grover *et al.* [72] abweicht. Allerdings wurde hier die Polymerisation in Gegenwart von 1 M Glutamat durchgeführt und die Inkubationszeit der Reaktionsmischung nicht ange-

geben. Wie in Abschnitt 2.1.5 beschrieben, verläuft die Inhibition nach einem Zwei-Stufen-Prozeß [26], bei dem sich vor dem Einbau des Colchicins in die Mikrotubuli erst ein Tubulin-Colchicin-Komplex bilden muß. Deshalb könnte man darin die Erklärung für die Abweichung des gefundenen IC_{50} -Wertes vom Literatur-Wert finden.

Das lineare Dolastatin 10-Derivat **41** wurde unter den bereits erwähnten Bedingungen auf seine Inhibition der Tubulin-Polymerisation im Bereich von 1 bis 10 μ M Inhibitor-Konzentration untersucht. Man erhält einen IC_{50} -Wert von ca. 3 μ M (Abb. 2.54).

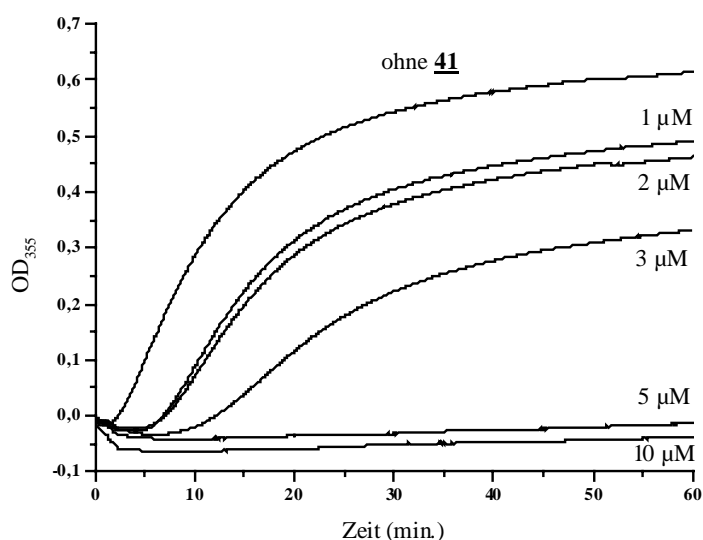


Abb. 2.54: Inhibition der Tubulin-Polymerisation durch **41** bei 25 °C, 100 mM Mes (pH 6.9), 5 % DMSO, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$ und 1 mM GTP.

Die zyklischen Peptide **16a,b,c** zeigen nur eine geringe inhibitorische Wirkung auf die Tubulin-Polymerisation. Von jeder Verbindung wurden Polymerisationsstudien in Gegenwart von 10 und 100 μ M **16a,b,c** durchgeführt (Abb. 2.55).

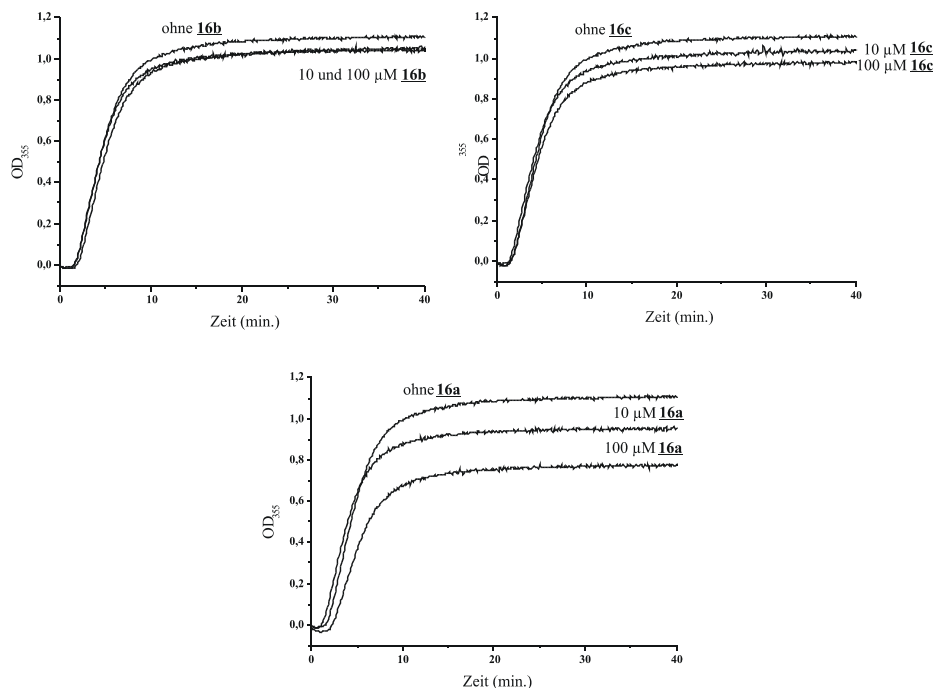


Abb. 2.55: Inhibition der Tubulin-Polymerisation durch **16a,b,c** bei 25 °C, 100 mM Mes (pH 6.9), 5 % DMSO, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ und 1 mM GTP.

Beim Vergleich der Inhibitionskurven von 100 µM **16a,b,c** stellt man eine Zunahme der inhibitorischen Wirkung mit zunehmender Kettenlänge des aliphatischen Linkers fest (Abb. 2.56).

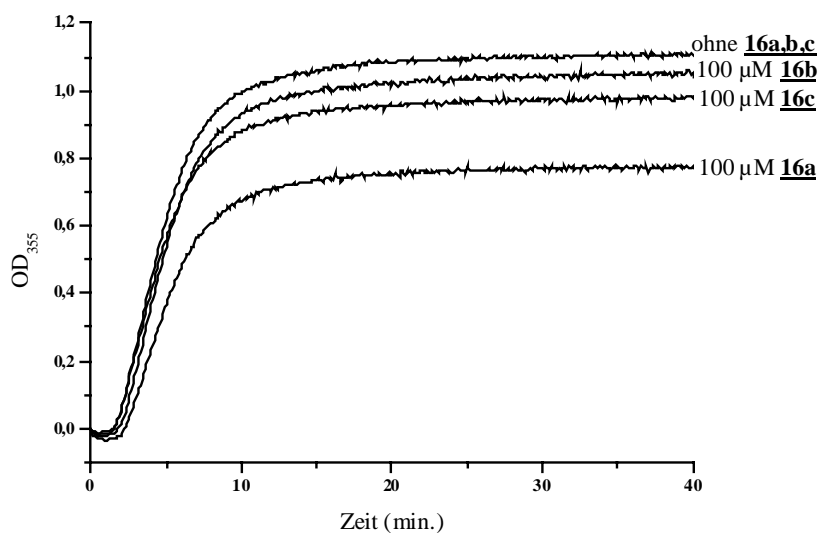


Abb. 2.56: Vergleich der Inhibition der Tubulin-Polymerisation durch 100 µM **16a,b,c** bei 25 °C, 100 mM Mes (pH 6.9), 5 % DMSO, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ und 1 mM GTP.

Dieser Effekt spricht für eine zunehmende Verzerrung des Peptidrückgrates durch die Zyklisierung der Verbindungen **16a,b,c** im Vergleich zu dem linearen Dolastatin 10-Derivat **41**. Die für die Bindung an das Tubulin verantwortliche Einheit, das Tripeptid Dov-Val-Dav, liegt somit nicht mehr in einer Konformation vor, welche im Dolastatin 10 eingenommen wird. Um zu überprüfen, ob die Alkylierung am N-Terminus der Verbindungen einen Einfluß auf die inhibitorische Wirkung der Dolastatin 10-Derivate besitzt, wurde die geschützte Vorstufe **13b** des zyklischen Peptids **16b** auf ihre Inhibition der Tubulin-Polymerisation überprüft. In Abb. 2.57 sind die Polymerisationskurven von Tubulin in Gegenwart von 1 bis 10 μM **13b** gezeigt, welche einen IC_{50} -Wert von ca. 6 μM für **13b** wiedergeben.

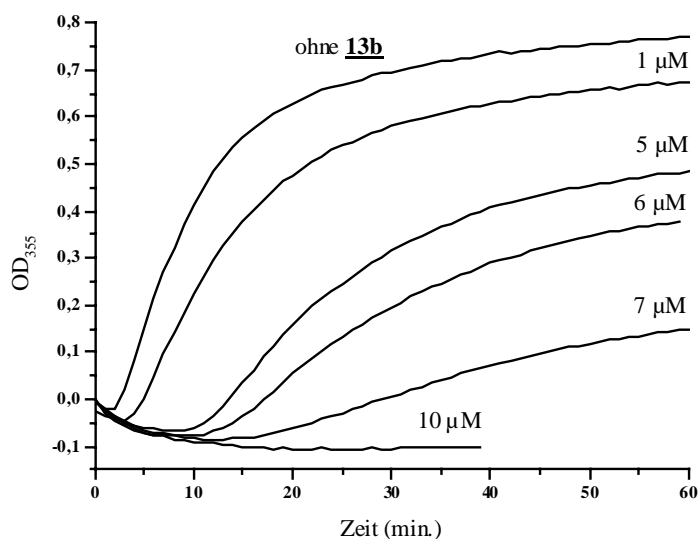


Abb. 2.57: Inhibition der Tubulin-Polymerisation durch **13b** bei 25 °C, 100 mM Mes (pH 6.9), 5 % DMSO, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 und 1 mM GTP.

Somit kann eine Störung der Inhibierung durch den Alkylrest im Dolavalin der Verbindungen **16a,b,c** bei der Tubulin-Polymerisation ausgeschlossen werden. Die schlechten inhibitorischen Eigenschaften der Verbindungen können auf die durch die Zyklisierung hervorgerufenen ungünstigen Konformationen zurückgeführt werden, welche durch die hohe Anzahl von Peptidbindungen (siehe Abschnitt 2.2.3) begünstigt werden.

Im Gegensatz zu den drei untersuchten zyklischen Peptiden **16a,b,c** zeigt das zyklische Dolastatin 10-Derivat **35a**, welches in Lösung als cis-Konformer bezüglich der Peptidbindung zwischen Dolavain und Prolin vorliegt, eine starke konzentrationsabhängige Inhibition bei der Tubulin-Polymerisation (Abb. 2.58). Der IC_{50} -Wert beträgt ca. $2\ \mu\text{M}$ und ist kleiner als der des linearen Dolastatin 10-Derivates **41**.

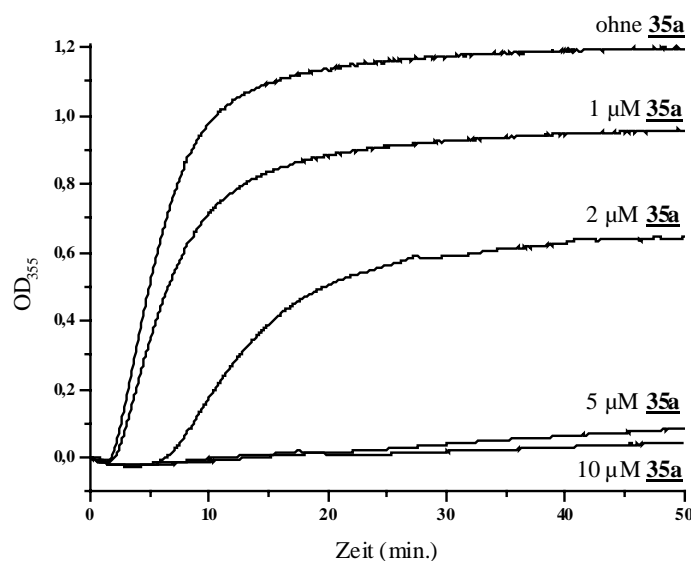


Abb. 2.58: Inhibition der Tubulin-Polymerisation durch **35a** bei $25\ ^\circ\text{C}$, $100\ \text{mM}$ Mes (pH 6.9), $5\ \%$ DMSO, $1\ \text{mM}$ EGTA, $1\ \text{mM}$ MgCl_2 und $1\ \text{mM}$ GTP.

Die Inhibition des zyklischen Peptides **35**, welches das trans-Konformer der Peptidbindung zwischen Dolavain und Prolin darstellt, der Tubulin-Polymerisation ergibt immerhin noch einen IC_{50} -Wert von ca. $20\ \mu\text{M}$ (Abb. 2.59).

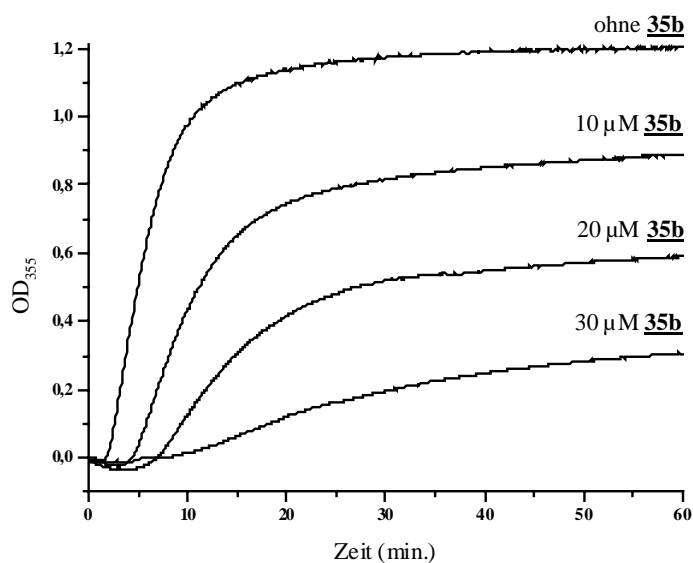


Abb. 2.59: Inhibition der Tubulin-Polymerisation durch **35b** bei 25 °C, 100 mM Mes (pH 6.9), 5 % DMSO, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ und 1 mM GTP.

Der inhibitorische Effekt von **35b** könnte zum einen durch einen kleinen Anteil des cis-Konformers hervorgerufen werden, welches im NMR-Spektrum nicht beobachtet werden konnte. Zum anderen könnte auch das trans-Konformer einen Einfluß auf die Tubulin-Polymerisation besitzen.

Parallel zu den NMR-spektroskopischen Bindungsstudien von ¹³C-markiertem Colchicin und ¹⁵N-markiertem Dolastatin 10-Derivat in Gegenwart von Tubulin (Abschnitt 2.2.11) wurde ihr Verhalten auf die Tubulin-Polymerisation unter NMR-Bedingungen über einen Zeitraum von zwölf Stunden beobachtet. In Abb. 2.60 sind die Polymerisationskurven von DEAE- (Abb. 2.60 a)) und MAP-Tubulin (Abb. 2.60 b)) in Gegenwart von 100 µM Colchicin (**48**) und 100 µM Dolastatin 10-Derivat (**41**) gezeigt.

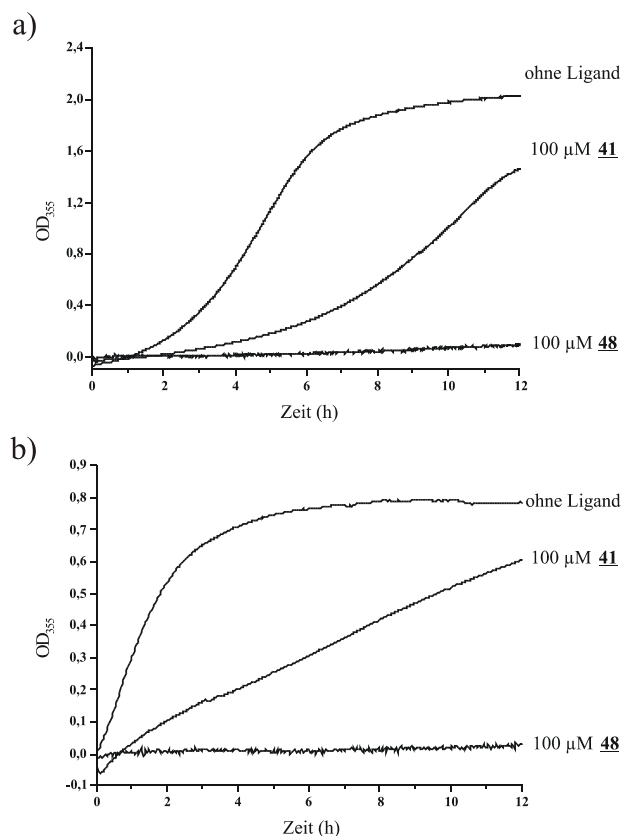


Abb. 2.60: Inhibition der Tubulin-Polymerisation von a) DEAE-Tubulin und b) MAP-Tubulin durch 100 µM 48 und 100 µM 41 bei 37 °C, 10 mM Pipes (pH 6.9), 10 % D₂O, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂.

Colchicin inhibiert die Tubulin-Polymerisation sowohl von DEAE- und MAP-Tubulin über einen Zeitraum von zwölf Stunden nahezu vollständig, während beim Dolastatin 10-Derivat 41 nach einem gewissen Zeitraum in beiden Fällen die Polymerisation des Tubulins beginnt.

2.2.10 Bestimmung der Kinetik der cis-trans-Isomerisierung von 41

Die Kinetik der cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung (Abb. 2.61) zwischen der Dolavain-Einheit und des Prolins in 41 wurde nach der Methode der chemischen Relaxation in Gleichgewichtsnähe nach einem Lösungsmittelsprung bestimmt [73].

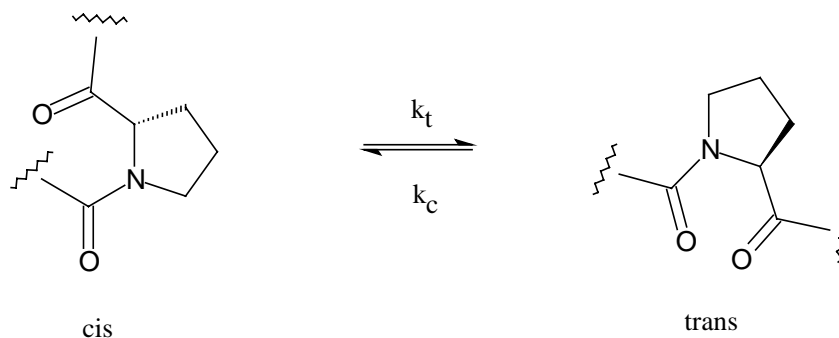


Abb. 2.61: *cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung zwischen Dolavain und Prolin in **41***

Das cis-Konformer in Verbindung **41** ist in DMSO und Methanol stärker populiert als in Wasser (pH 7.0), wobei der cis-Gehalt in den organischen Lösungsmitteln mit 32 % bzw. 42 % höher liegt als in wässriger Lösung (23 % cis-Gehalt, Abb. 2.62).

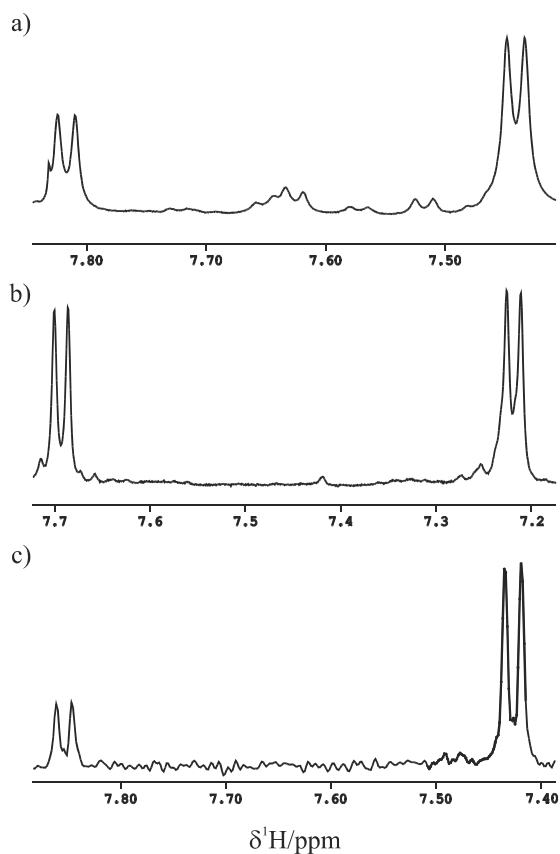


Abb. 2.62: H^N -Bereich der ^1H -NMR-Spektrum von **41** in a) Methanol- d^3 , b) DMSO- d^6 und c) 10 mM Phosphatpuffer (pH 7.0), 10 % D_2O bei 277 K. Das tieffeldigere Signal entspricht dem cis-Konformer.

Durch schnelle Verdünnung der DMSO- oder Methanol-Stammlösung mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) kann die Rückkehr der cis-trans-Isomerisierung in den Gleichgewichtszustand NMR-spektroskopisch beobachtet werden. Die Reaktion wurde

durch Integration der Signale des cis- und des trans-Konformers im eindimensionalen ^1H -NMR-Spektrum verfolgt [74] (Abb. 2.63).

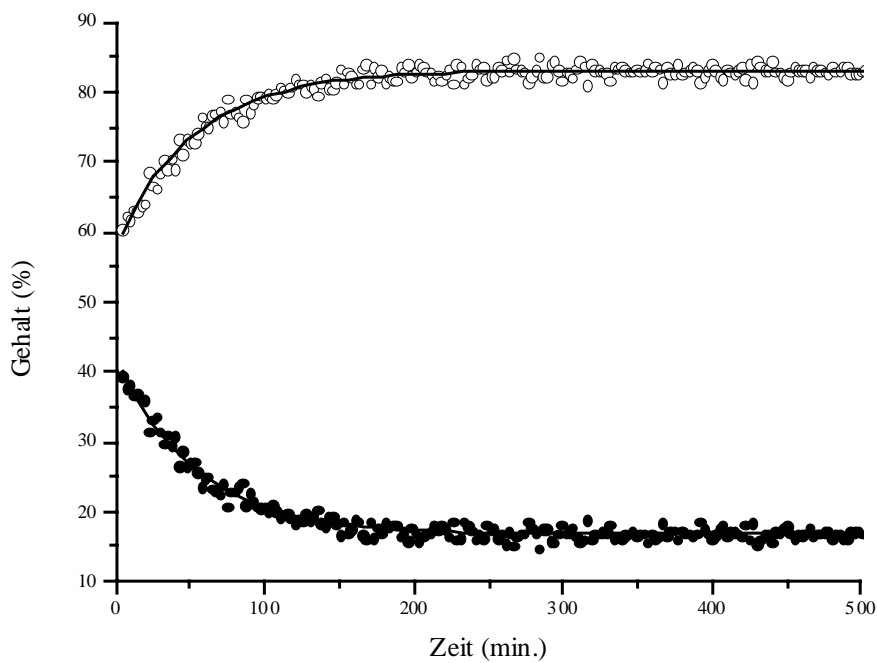


Abb. 2.63: Zeitabhängigkeit des cis- und trans-Gehaltes in **41** nach Lösungsmittelsprung von DMSO zu 10 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) bei 277 K. Die zeitabhängige Änderung wurde durch Auswertung des entsprechenden Signalintegrals des cis- (●) und des trans-Isomers (○) verfolgt. Die durchgezogenen Linien zeigen die Anpassung der Daten an die Gleichungen 2.1 und 2.2.

Aus den Änderungen der Isomerenverteilung wurden nach Gleichung 2.1 und 2.2 die Geschwindigkeitskonstanten k_c und k_t für die cis-trans-Isomerisierung berechnet (Herleitung s. Anhang).

$$[cis]_t = [cis]_{\infty} + ([cis]_0 - [cis]_{\infty}) \exp\left(-\frac{k_c t}{[trans]_{\infty}}\right) \quad 2.1$$

$$[trans]_t = [trans]_{\infty} - ([trans]_{\infty} - [trans]_0) \exp\left(-\frac{k_t t}{[cis]_{\infty}}\right) \quad 2.2$$

Die Geschwindigkeitskonstanten der cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung zwischen Dolavain und Prolin in **41** wurden für jedes Lösungsmittel durch jeweils zwei

Messungen bestimmt. Der Wert von k_c beträgt $2.5 \pm 0.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $6.3 \pm 0.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ für k_t bei 277 K. Die cis-trans-Isomerisierung in **41** zählt somit im Vergleich zu den Untersuchungen von Xaa-Pro-Fragmenten von Reimer *et al.* [73] zu den langsameren Reaktionen.

2.2.11 NMR-spektroskopische Untersuchungen des ^{15}N -markierten Dolastatin 10-Derivates in Gegenwart von Tubulin

Für die NMR-spektroskopische Untersuchung des ^{15}N -markierten Dolastatin 10-Derivates **49** (Abb. 2.64) in Gegenwart von Tubulin wurde zunächst die Kinetik der Bindung an das Tubulin verfolgt.

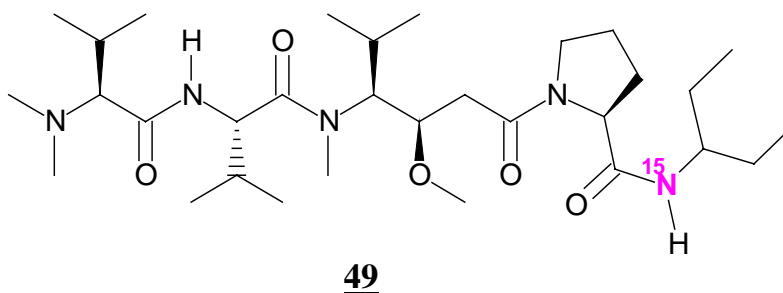


Abb. 2.64: Strukturformel des ^{15}N -markierten Dolastatin 10-Derivates

Hierfür wurde von der BASF AG (Ludwigshafen) Tubulin zur Verfügung gestellt, welches für die NMR-Messungen nochmals einem Polymerisations-/Depolymerisationsschritt unterzogen wurde. Nach Zugabe der ^{15}N -markierten Verbindung **49** zu der Tubulin-Lösung im Verhältnis 1:1 wurden nacheinander drei eindimensionale ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren mit 64 Transienten und ein eindimensionales ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum mit 1024 Transienten bei 298 K aufgenommen. In Abb. 2.65 ist der zeitliche Verlauf des Experiments gezeigt.

Man beobachtete die Abnahme des Signals des cis-Konformers von **49**, welches nach ca. 60 Minuten wieder im Spektrum auftauchte. Dies deutet darauf hin, daß das cis-Konformer sich schnell an das Tubulin anlagert und das Signal wegen der Größe des

Proteins (ca. 110 kDa) im NMR-Spektrum nicht mehr auftaucht. Nach der Wiedereinstellung des cis-trans-Gleichgewichtes erscheint das Signal wieder im Spektrum.

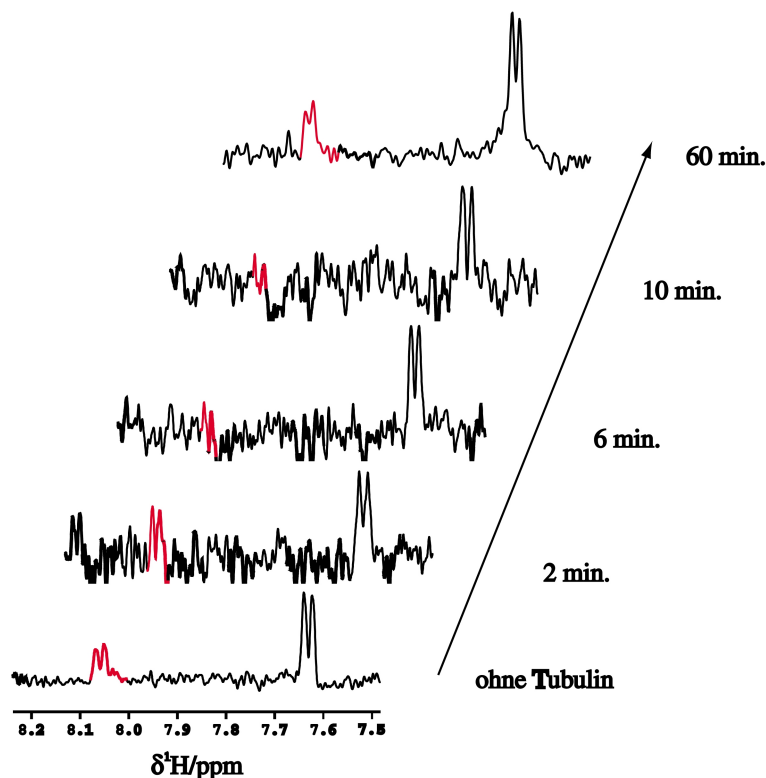


Abb. 2.65: H^N -Bereich der eindimensionalen 1H - ^{15}N -HSQC in Abhängigkeit von der Zeit, 10 mM Pipes (pH 6.9), 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, AMX600, 298 K. In rot ist das Signal des cis-Konformers von 49 gezeigt.

Allerdings konnte dieser Effekt nur beim ersten Experiment festgestellt werden. Anschließende Versuche, die Beobachtung zu bestätigen, scheiterten daran, daß das Tubulin von der BASF AG durch die Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht mehr funktionsfähig war.

Für die weiteren Experimente wurde *twice-cycled* Tubulin (Abschnitt 2.2.8) für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen verwendet. Hierbei stellten sich meßtechnische Probleme ein, welche auf die hohe Viskosität der Protein-Lösung hervorgerufen durch die noch vorhandenen Störproteine (MAPs, τ -Protein usw., Abb. 2.50) zurückzuführen sind. Man erhielt keine homogene NMR-Probe.

Deshalb wurden für die weiteren Bindungsstudien zum einen weiter aufgereinigtes Tubulin in Form von DEAE- und MAP-Tubulin (Abschnitt 2.2.8) verwendet und zum anderen ^{13}C -markiertes Colchicin (Abschnitt 2.2.7) als Standard eingeführt, mit dessen Hilfe man die Qualität des Tubulins überprüfte.

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden sowohl DEAE-Tubulin als auch MAP-Tubulin im Verhältnis 1:1 zu ^{13}C -markiertem Colchicin **48** unter den gleichen Bedingungen wie bei den Polymerisationsstudien (s. Abb. 2.60) zusammengegeben und vor den Messungen eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils zweidimensionale ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren bei 310 K aufgenommen.

In Abb. 2.66 sind die entsprechenden Spuren der ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren von ^{13}C -markiertem Colchicin **48** und 2,2,3,3-Tetradeutero-3-(trimethylsilyl)-propionsäure (TSP) gezeigt. Das linke Signal entspricht der Methylgruppe der N-Acetylgruppe im Colchicin und das rechte Signal TSP, welches als Linienbreitenstandard eingesetzt wurde.

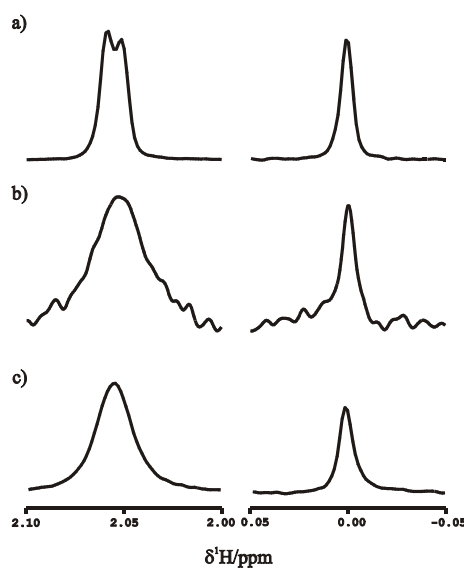


Abb. 2.66: Reihen aus dem zweidimensionalen ^1H - ^{13}C -HSQC, 10 mM Pipes (pH 6.9), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , DRX600, 310 K. Links ist das Signal der Methylgruppe der N-Acetylgruppe des ^{13}C -markierten Colchicins **48** und rechts das Signal von TSP gezeigt. a) ohne Tubulin, b) mit DEAE-Tubulin und c) mit MAP-Tubulin.

In den Spektren Abb. 2.66 b) und c) ist eine Linienverbreiterung des Signals der Methylgruppe im ^{13}C -markiertem Colchicin in Gegenwart von DEAE-Tubulin um ca. 270 % und MAP-Tubulin um ca. 180 % im Vergleich zu TSP zu beobachten (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Halbwertsbreiten der Signale von TSP und ^{13}C -markiertem Colchicin im Vergleich

	$\Delta\nu_{1/2}(\text{TSP})$	$\Delta\nu_{1/2}(\text{Colchicin})$
ohne Tubulin	1.2 Hz	6.1 Hz
DEAE-Tubulin	1.2 Hz	14.6 Hz
MAP-Tubulin	1.2 Hz	10.1 Hz

Die Halbwertsbreiten des TSP-Signals zeigen keinen Effekt aufgrund der erhöhten Viskosität in Gegenwart des Proteins wie noch im Falle des *twice-cycled* Tubulins. An den Integralen der beiden Signale in den ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren (Tabelle 2.4) kann man erkennen, daß zwei Drittel des Colchicins nach einer Meßzeit von elf Stunden fest am Tubulin gebunden sind und nicht zu dem Signal im Spektrum beitragen.

Tabelle 2.4: Relative Integrale der Signale von TSP und ^{13}C -markiertem Colchicin im Vergleich. Das Integral von TSP wurde auf eins gesetzt.

	Integral(TSP)	Integral(Colchicin)
ohne Tubulin	1	17.1
DEAE-Tubulin	1	5.8
MAP-Tubulin	1	6.5

Aus den Halbwertsbreiten der Signale (Tabelle 2.3) kann man die effektive Korrelationszeit τ_c des Colchicins für die verschiedenen Zustände berechnen.

Die Linienbreite eines Signals $\Delta\nu_{1/2}$ wird bestimmt durch die transversale Relaxationsrate R_2^* (Gleichung 2.3) und setzt sich aus der sog. homogenen Linienbreite (R_2) und

der sog. inhomogenen Linienbreite (R_{in}) zusammen (Gleichung 2.4), wobei letztere von Magnetfeld-Inhomogenitäten (*shim*) hervorgerufen wird [75].

$$\Delta \nu_{1/2} = \pi R_2^* \quad 2.3$$

$$R_2^* = R_2 + R_{in} \quad 2.4$$

Der Anteil der inhomogenen Linienverbreiterung der Signale ist durch die Linienbreite des TSP gegeben, weil hier weitere Beiträge zur Linienbreite aufgrund von Relaxation vernachlässigt werden können [76].

Die transversale Relaxationsrate R_2 in der ^1H -Dimension des ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrums wird durch dipolare Wechselwirkungen mit weiteren Protonen und direkt gebundenen ^{13}C -Heterokernen hervorgerufen [77]. Im Falle der Methylgruppe im Colchicin muß man für die Berechnung der effektiven Korrelationszeit τ_c des Colchicins die Relaxation der dipolaren Wechselwirkungen der Protonen in der Methylgruppe untereinander (R_2^{HH}) und die der Protonen in der Methylgruppe mit dem ^{13}C -Atom der Methylgruppe (R_2^{CH}) berücksichtigen (Gleichung 2.5).

$$R_2 = R_2^{HH} + R_2^{CH} \quad 2.5$$

Die transversalen Relaxationsraten R_2^{HH} und R_2^{CH} für die Resonanzen in der ^1H -Dimension werden durch die Gleichungen 2.6 und 2.7 beschrieben [77].

$$R_2^{HH} = p_H^2 (5J(0) + 9J(\omega_H) + 6J(2\omega_H)) \quad 2.6$$

$$R_2^{CH} = p^2 (4J(0) + 3J(\omega_H) + J(\omega_H - \omega_C) + 3J(\omega_C) + 6J(\omega_H + \omega_C)) \quad 2.7$$

mit $p = \frac{\mu_0 \gamma_H \gamma_C \hbar}{4\pi \sqrt{2} r_{HC}^3}$ und $p_H = \frac{\mu_0 \gamma_H^2 \hbar}{4\pi \sqrt{2} r_{HH}^3}$, ω_H und ω_C als Larmor-Frequenzen der Spins

^1H und ^{13}C , γ_H und γ_C als gyromagnetisches Verhältnis der Kerne ^1H und ^{13}C , \hbar als

Plancksches Wirkungsquantum, r_{HC} und r_{HH} als Abstände der Kerne und B_0 als polarisierendes Magnetfeld.

Bei den transversalen Relaxationsraten R_2^{HH} und R_2^{CH} muß in der Gleichung für die spektrale Leistungsdichte $J(\omega)$ noch die schnelle Rotation der Methylgruppe berücksichtigt werden. Die spektrale Leistungsdichte $J(\omega)$ beschreibt die Fourier-Transformierte der Korrelationsfunktion $C(t)$, welche die Bewegung des Moleküls in Abhängigkeit von der Zeit wiedergibt. Für die betrachteten transversalen Relaxationsraten wurde das Modell der isotropen Rotationsdiffusion eines starren Rotators angenommen.

Für die schnelle Rotation der Methylgruppe wurde der Ansatz von Lipari und Szabo verwendet [78,79], welcher die spektralen Leistungsdichten durch den Ordnungsparameter S aufgrund von unterschiedlichen Bewegungen - z.B. Rotation oder Diffusion - gewichtet. Das Quadrat des Ordnungsparameters S beschreibt die relative Verteilung der Relaxation, welche durch die Gesamtbewegung des Moleküls und die zusätzliche interne Rotation hervorgerufen wird. S^2 nimmt Werte zwischen 0 und 1 ein. Für $S = 1$ ist die interne Bewegung vollständig eingeschränkt, während für $S = 0$ eine freie interne Bewegung gilt. Die spektrale Leistungsdichte $J(\omega)$ ist dann durch Gleichung 2.8 gegeben.

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2 \tau_c}{(1 + (\tau_c \omega)^2)} + \frac{(1 - S^2) \tau}{(1 + (\tau \omega)^2)} \right) \quad 2.8$$

bei der $\tau^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_m^{-1}$ und τ_m die Korrelationszeit der Rotation der Methylgruppe beschreibt. Wenn die Gesamtbewegung des Moleküls deutlich langsamer als die schnelle Rotation der Methylgruppe ist ($\tau_m \ll \tau_c$), reduziert sich Gleichung 2.8 zu:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2 \tau_c}{(1 + (\tau_c \omega)^2)} + \frac{(1 - S^2) \tau_m}{(1 + (\tau_m \omega)^2)} \right) \quad 2.9$$

Der Ordnungsparameter S ist im Falle der ungehinderten Rotation der Methylgruppe um die C-C-Einfachbindung durch Gleichung 2.10 definiert [80].

$$S^2 = \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right)^2 \quad 2.10$$

θ beschreibt den Winkel zwischen der Verbindungslinie zwischen des betrachteten Dipols und der Rotationsachse um die C-C-Einfachbindung. Im Falle der transversalen Relaxationsrate R_2^{HH} zwischen den Protonen beträgt $\theta = 90^\circ$ und es ergibt sich für S_{HH}^2 gemäß Gleichung 2.10 ein Wert von 0.25. Für R_2^{CH} ist der Winkel $\theta = 70.5^\circ$ und S_{CH}^2 somit 0.111.

Der zweite Term in Gleichung 2.9 kann vernachlässigt werden, weil die Korrelationszeit der Rotation der Methylgruppe τ_m in der Größenordnung von einer Pikosekunde liegt und er deshalb keinen Einfluß auf die spektrale Leistungsdichte $J(\omega)$ besitzt.

Aus den Gleichungen 2.3, 2.6, 2.7, 2.8 und 2.9 kann man die effektive Korrelationszeit τ_c für Colchicin sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von DEAE- und MAP-Tubulin aus den Linienbreiten im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (Tabelle 2.3) berechnen. Mit $r_{\text{HC}} = 111$ pm und $r_{\text{HH}} = 181$ pm erhält man für τ_c die Werte, welche in Tabelle 2.5 angegeben sind.

Tabelle 2.5: Effektive Korrelationszeiten des Colchicins mit und ohne DEAE-Tubulin und MAP-Tubulin

	$\tau_c(\text{Colchicin})$
ohne Tubulin	328 ps
DEAE-Tubulin	1.24 ns
MAP-Tubulin	756 ps

Die effektiven Korrelationszeiten des Colchicins in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin sind größer als die des Colchicins in Abwesenheit von Tubulin. Allerdings lie-

gen sie auch nicht in Größenordnung der Korrelationszeit eines Proteins von ca. 100 kDa, welche ca. 60 ns beträgt. Daraus kann man abschätzen, daß im Falle des DEAE-Tubulins 2 % und im Falle des MAP-Tubulins 1 % des Colchicins in Form eines schwach gebundenen Tubulin-Colchicin-Komplexes vorliegen (Abb. 2.67), welcher zu einer Linienverbreiterung des Signals im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (Abb. 2.66 b) und c)) führt. Das Signal im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum repräsentiert demzufolge das freie, nicht fest an das Tubulin gebundene Colchicin, welches sich im schnellen Austausch mit der gebundenen Form des Colchicins im Tubulin befindet.

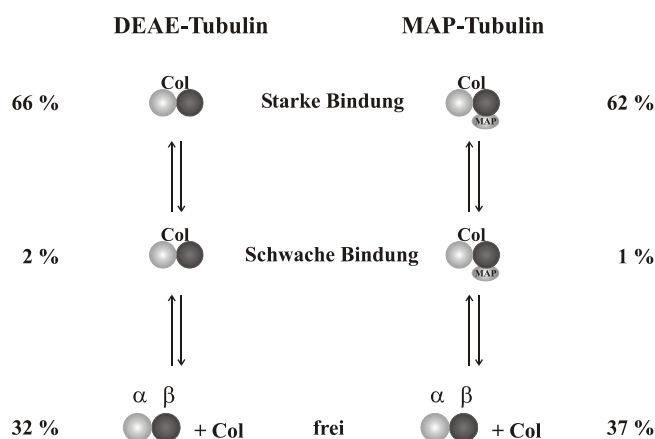


Abb. 2.67: Modell für die Bindung des Colchicins (Col) an DEAE- und MAP-Tubulin

Die etwas unterschiedlichen Populationen des Colchicins in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin zeigen, daß in Gegenwart der MAPs die Energie sowohl des schwach gebundenen Zustands als auch die des stark gebundenen Zustands angehoben wird (Abb. 2.68). Dies könnte auf einen allosterischen Effekt der MAPs auf die β -Untereinheit der Tubulins hindeuten, welcher sich auf die Bindung des Colchicins auswirkt.

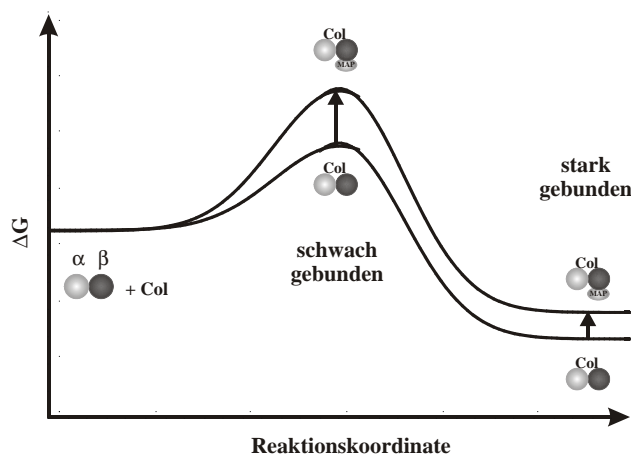


Abb. 2.68: Energieprofil der Bindung von Colchicin (Col) an DEAE- und MAP-Tubulin

Bei den Polymerisationsstudien von DEAE- und MAP-Tubulin in Gegenwart von Colchicin (Abb. 2.60) unter den gleichen Bedingungen wie bei den NMR-Experimenten wurde die Polymerisation des Tubulins vollständig inhibiert. Der Anteil des Colchicins, welcher nicht zu dem Signal im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum beiträgt, liegt in Form eines stabilen Colchicin-Tubulin-Komplexes vor. Aus den Integralen des Signals im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (Tabelle 2.4) kann man die Gleichgewichtskonstante zwischen der freien und der gebundenen Form des Colchicins berechnen. Die Gesamtkonzentration des Colchicins und des Tubulins liegt bei $100\ \mu\text{M}$. Daraus ergibt sich eine Gleichgewichtskonstante von ca. $6 \times 10^4\ \text{M}^{-1}$ bei $310\ \text{K}$, welche sich in der Größenordnung der aus Fluoreszenzmessungen bestimmten Gleichgewichtskonstanten von ca. $6 \times 10^3\ \text{M}^{-1}$ befindet [26].

Die NMR-spektroskopischen Bindungsstudien des ^{15}N -markierten Dolastatin 10-Derivates **49** in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin im Verhältnis 1:1 wurden an Proben durchgeführt, welche den Bedingungen der Polymerisationsstudien (s. Abb. 2.60) entsprechen. Vor den Messungen wurden die Proben eine Stunde bei $37\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden in beiden Dimensionen gekoppelte ^1H - ^{15}N -HSQC- und ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren [81] aufgenommen. Mit Hilfe der

gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren wurden die Linienbreiten der einzelnen Signale des Multipletts untersucht, welche durch die Bindung des kleinen Liganden **49** an das große Protein Tubulin bei hohen Feldstärken (600 und 800 MHz) eventuell unterschiedlich sein könnten [82].

Die ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren filtern das sog. TROSY-Signal, welches die kleinste Linienbreite besitzt, aus dem Multiplett der gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren durch Verwendung eines entsprechenden Phasencyclus heraus. Außerdem können zusätzliche Resonanzen von dem am Tubulin gebundenen Liganden auftreten, weil durch dieses Experiment die Molmassengrenze der NMR-Spektroskopie auf ca. 100 kDa nach oben verschoben wird [81].

In Abb. 2.69 und Abb. 2.70 sind die in beiden Dimensionen gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC- und ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren von a) der 100 μM Vergleichsprobe von **49**, b) 100 μM **49** in Gegenwart von 100 μM DEAE-Tubulin und c) 100 μM **49** in Gegenwart von 100 μM MAP-Tubulin gezeigt.

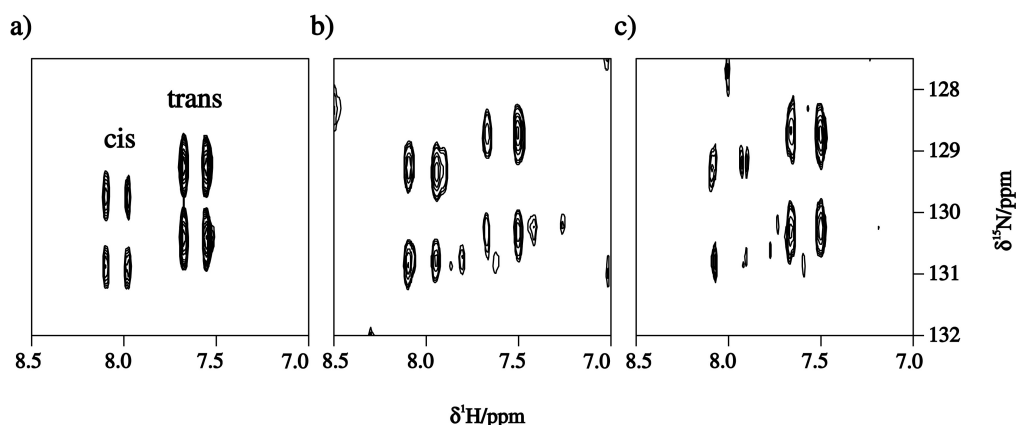


Abb. 2.69: ^1H -Bereich der in beiden Dimensionen gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQCs von **49** bei 600 MHz, 10 mM Pipes (pH 6.9), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 310 K. Das tieffeldigere Signal entspricht dem cis-Konformer, das hochfeldigere dem des trans-Konformers von **49**. In a) ist das entsprechende Spektrum der 100 μM Vergleichsprobe von **49** ohne Tubulin, in b) 100 μM **49** in Gegenwart von 100 μM DEAE-Tubulin und in c) 100 μM **49** in Gegenwart von 100 μM MAP-Tubulin gezeigt.

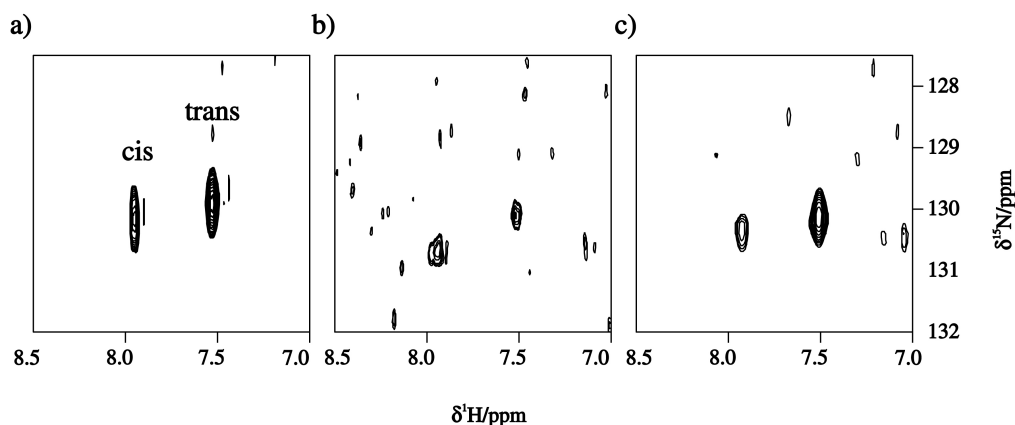


Abb. 2.70: H^N -Bereich der 1H - ^{15}N -TROSYs von **49** bei 600 MHz, 10 mM Pipes (pH 6.9), 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 310 K. Das tieffeldigere Signal entspricht dem cis-Konformer, das hochfeldigere dem des trans-Konformers von **49**. In a) ist das entsprechende Spektrum der 100 μM Vergleichsprobe von **49** ohne Tubulin, in b) 100 $\mu M **49** in Gegenwart von 100 μM DEAE-Tubulin und in c) 100 $\mu M **49** in Gegenwart von 100 μM MAP-Tubulin gezeigt.$$

In den Spektren entspricht das tieffeldigere Signal dem cis-Konformer und das hochfeldigere Signal dem trans-Konformer von **49**. Man beobachtet ein unterschiedliches Verhalten von **49** in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin. Allerdings wurden in den 1H - ^{15}N -TROSY-Spektren keine zusätzlichen Signale beobachtet, welche auf weitere gebundene Konformationen hindeuten würden.

Im Falle des DEAE-Tubulins im Verhältnis 1:1 mit dem ^{15}N -markierten Dolastatin 10-Derivat **49** erkennt man sowohl im gekoppelten 1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum als auch im 1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum, daß das tieffeldigere Signal des cis-Konformers der Verbindung **49** nahezu das gleiche Integral wie das hochfeldigere Signal des trans-Konformers besitzt (Abb. 2.69 b) und Abb. 2.70 b)). Die ermittelten Integrale für das Signal des cis- und des trans-Konformers von **49** aus den 1H - ^{15}N -TROSY-Spektren in Tabelle 2.6 sind gegenüber dem Integral über die gleiche Fläche des Rauschens normiert. Die Integrale der einzelnen Komponenten in den 1H - ^{15}N -HSQC-Spektren für die Signale des cis- und trans-Konformers von **49** sind in Tabelle 7.22 (Kapitel 7) angegeben und führen zu dem gleichen Ergebnissen.

An den relativen Integralen der Signale von **49** in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin kann man erkennen, daß – wie auch im Falle des Colchicins - ca. zwei Drittel der Verbindung nach 12 bis 16 Stunden Meßzeit fest am Tubulin gebunden ist und nicht zu den Signalen im Spektrum beitragen.

Der cis-Gehalt von **49** in Gegenwart von DEAE-Tubulin beträgt ca. 45 %, während er sich nur auf ca. 24 % ohne Tubulin (Abb. 2.69 a) und Abb. 2.70 a)) und auf ca. 25 % in Gegenwart von MAP-Tubulin (Abb. 2.69 c) und Abb. 2.70 c)) beläuft. Der cis-Gehalt von **49** ist im Falle des MAP-Tubulins gleich dem ohne Tubulin. Aus den Integralen der Signale im ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum der beiden Konformere von **49** kann man erkennen, daß nur ca. 27 % bzw. 33 % von **49** in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin zum Signal beitragen. Der Rest der Verbindung ist fest am Tubulin gebunden.

Tabelle 2.6: Relative Integrale der Signale des cis- und trans-Konformer von **49**, sowie Gehalt des cis-Konformers von **49** mit und ohne DEAE-Tubulin und MAP-Tubulin in den ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren bei 600 und 800 MHz.

	Integral(cis)	Integral(trans)	cis-Gehalt von 49
ohne Tubulin 600 MHz	15.4	50.4	24 %
ohne Tubulin 800 MHz	13.5	43.1	24 %
DEAE-Tubulin 600 MHz	7.8	9.7	45 %
MAP-Tubulin 600 MHz	5.35	16.1	25 %
MAP-Tubulin 800 MHz	6.36	17.6	26 %

Der höhere cis-Gehalt von **49** in Gegenwart von DEAE-Tubulin im Vergleich zu dem von **49** ohne Tubulin und **49** in Gegenwart von MAP-Tubulin könnte zum einen durch eine feste Bindung des trans-Konformers von **49** an das Tubulin oder die Mikrotubuli erklärt werden. Deshalb könnte das Signal des trans-Konformers von **49** reduziert wor-

den sein. Zum anderen könnte aber das Signal des cis-Konformers von **49** auch den an das Tubulin schwach gebundenen Liganden repräsentieren.

Bei den entsprechenden Messungen mit MAP-Tubulin und dem ^{15}N -markierten Dolastatin 10-Derivat **49** im Verhältnis 1:1 (Abb. 2.69 c), Abb. 2.70 c)) erkennt man bei der tieffeldigeren Resonanz des cis-Konformers eine unterschiedliche Linienbreite der einzelnen Multipllett Komponenten sowohl bei 600 MHz als auch bei 800 MHz (Abb. 2.71).

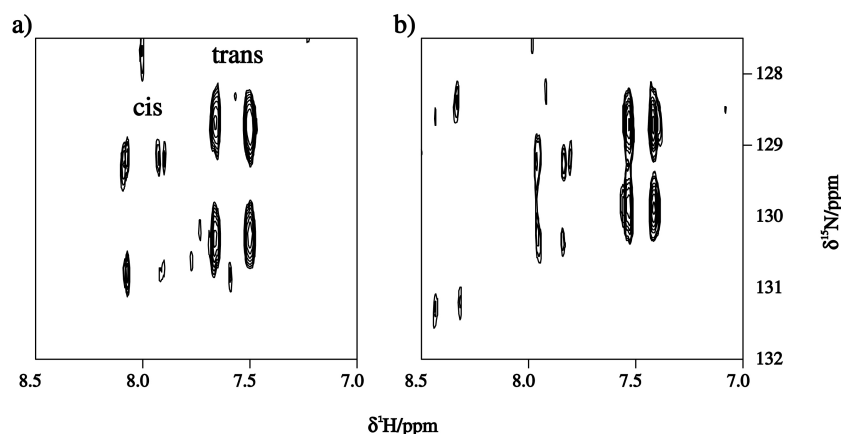


Abb. 2.71: ^1H -Bereich des in beiden Dimensionen gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQCs von **49** in Gegenwart von MAP-Tubulin bei a) 600 MHz und b) 800 MHz. 10 mM Pipes (pH 6.9), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 310 K. Das tieffeldigere Signal entspricht dem cis-Konformer, das hochfeldigere dem des trans-Konformers von **49**.

Im Gegensatz hierzu besitzen die Linienbreiten des Signals des trans-Konformers von **49** sowohl bei DEAE- als auch bei MAP-Tubulin die gleichen Werte wie die der Vergleichsprobe ohne Tubulin.

Anhand der unterschiedlichen Linienbreiten kann man die Korrelationszeit τ_c für den Liganden **49** im schwachen Komplex mit dem Tubulin berechnen. Der beobachtete TROSY-Effekt im gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC (Abb. 2.71) beruht auf einer additiven und subtraktiven Wechselwirkung der Relaxation von Dipol-Dipol-Kopplung (DD) und chemischer Verschiebungsanisotropie (CSA) für die einzelnen Spin-zustände (N^α und N^β), welche in der ^1H -Dimension des Spektrums die unterschiedli-

chen Linienbreiten der Resonanzen bewirkt [82]. Bei den entsprechenden Messungen des freien Liganden **49** (Abb. 2.69 a)) und von **49** in Gegenwart von DEAE-Tubulin (Abb. 2.69 b)) sieht man zwar keinen ausgeprägten TROSY-Effekt, allerdings wurden auch hier die Halbwertsbreiten der Signale nach dem folgenden Verfahren analysiert.

Abb. 2.72 zeigt schematisch das Multiplett im gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC mit den für die einzelnen Komponenten wirksamen transversalen Relaxationsraten.

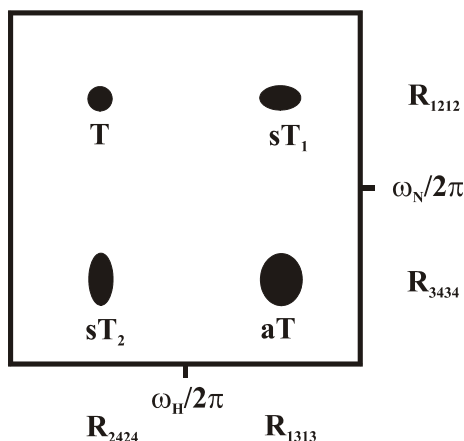


Abb. 2.72: Schematische Darstellung des Multipletts im gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC mit TROSY-Effekt nach [83]. Das sog. TROSY-Signal (T) ist die Komponente des Multipletts mit der kleinsten Linienbreite in beiden Dimensionen. Die semi-TROSY-Signale sT_1 und sT_2 und das anti-TROSY-Signal aT sind eingezeichnet. Die für die Linienbreite verantwortlichen transversalen Relaxationsraten R sind angegeben.

Die Bezeichnung der Signale wurde von Sørensen *et al.* [83] übernommen.

Die transversalen Relaxationsraten R_{1313} und R_{2424} für die Resonanzen in der ^1H -Dimension werden durch Gleichungen 2.11 und 2.12 beschrieben [84].

$$R_{1313} = (p - \delta_H)^2 (4J(0) + 3J(\omega_H)) + p^2 (J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)) + 3\delta_N^2 J(\omega_N) + p_H^2 \left(\frac{5}{2} J(0) + \frac{9}{2} J(\omega_H) + 3J(2\omega_H) \right) \quad 2.11$$

$$R_{2424} = (p + \delta_H)^2 (4J(0) + 3J(\omega_H)) + p^2 (J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)) + 3\delta_N^2 J(\omega_N) + p_H^2 \left(\frac{5}{2} J(0) + \frac{9}{2} J(\omega_H) + 3J(2\omega_H) \right) \quad 2.12$$

$$\text{mit } p = \frac{\mu_0 \gamma_H \gamma_N h}{4\pi \sqrt{2} r_{HN}^3}, \quad \delta_H = \frac{1}{3\sqrt{2}} \gamma_H B_0 \Delta\sigma_H, \quad p_H = \frac{\mu_0 \gamma_H^2 h}{4\pi \sqrt{2} r_{HH}^3}, \quad \omega_H \text{ und } \omega_N \text{ als Larmor-}$$

Frequenzen der Spins ^1H und ^{15}N , γ_H und γ_N als gyromagnetisches Verhältnis der Kerne ^1H und ^{15}N , h als Plancksches Wirkungsquantum, r_{HN} und r_{HH} als Abstände der Kerne, B_0 als polarisierendes Magnetfeld und $\Delta\sigma_H$ als Differenz der axialen und senkrechten Hauptachse des axial symmetrischen chemischen Verschiebungstensor des Spins ^1H . Die Funktion der spektralen Leistungsdichte $J(\omega)$ bei der entsprechenden Frequenz ω ist durch Gleichung 2.13 gegeben.

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{5(1 + (\tau_c \omega)^2)} \quad 2.13$$

Mit dem Makro *ldcon* der Software UXNMR, Version 2.6 (Bruker Instruments, Rheinstetten), wurden die Linienbreiten der entsprechenden Reihen in den zweidimensionalen ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren analysiert. Das Makro fittet eine ideale Lorentzkurve an die experimentellen Daten an. Das für die exponentielle Apodisierung der Spektren verwendete *line broadening* wurde von den ermittelten Werten abgezogen. In Tabelle 2.7 sind die bestimmten Halbwertsbreiten der einzelnen Resonanzen des Multipletts im ^1H - ^{15}N -HSQC des cis-Konformers von **49** in Gegenwart von MAP-Tubulin angegeben.

Tabelle 2.7: Halbwertsbreiten der vier Signale im gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC des cis-Konformers von **49** in Gegenwart von MAP-Tubulin bei 600 und 800 MHz. T, ST_1 , ST_2 und AT stehen für TROSY-, Semi-TROSY- in ω_1 , Semi-TROSY- in ω_2 und Anti-TROSY-Signal nach [83]

Signal	600 MHz	800 MHz
T	13.4 Hz	11.5 Hz
ST_1	15.6 Hz	14.5 Hz
ST_2	14.7 Hz	13.5 Hz
AT	17.5 Hz	16.4 Hz

Für die Berechnung der Korrelationszeit τ_c wurden die aus den Spektren extrahierten Linienbreiten mit den transversalen Relaxationsraten R durch Formel 2.11 in Zusammenhang gesetzt. Um die durch sonstige Einflüsse resultierende Linienverbreiterung der Signale z.B. Magnetfeld-Homogenität (*shim*) aus den bestimmten Linienbreiten zu extrahieren, wurde die Korrelationszeit τ_c für das schwach an das Tubulin gebundene cis-Konformer von **49** durch die Differenz der beiden transversalen Relaxationsraten R_{1313} (Gleichung 2.11) und R_{2424} (Gleichung 2.12) berechnet.

Ebenso wurden die Linienbreiten des cis-Konformers von **49** in den gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von **49** ohne Tubulin (Abb. 2.69 a)) und von **49** in Gegenwart von DEAE-Tubulin (Abb. 2.69 b)) bestimmt (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Halbwertsbreiten der vier Signale im gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC des cis-Konformers von **49** ohne Tubulin und **49** in Gegenwart von DEAE-Tubulin bei 600 MHz. T, ST_1 , ST_2 und AT stehen für TROSY-, Semi-TROSY- in ω_1 , Semi-TROSY- in ω_2 und Anti-TROSY-Signal nach [83]

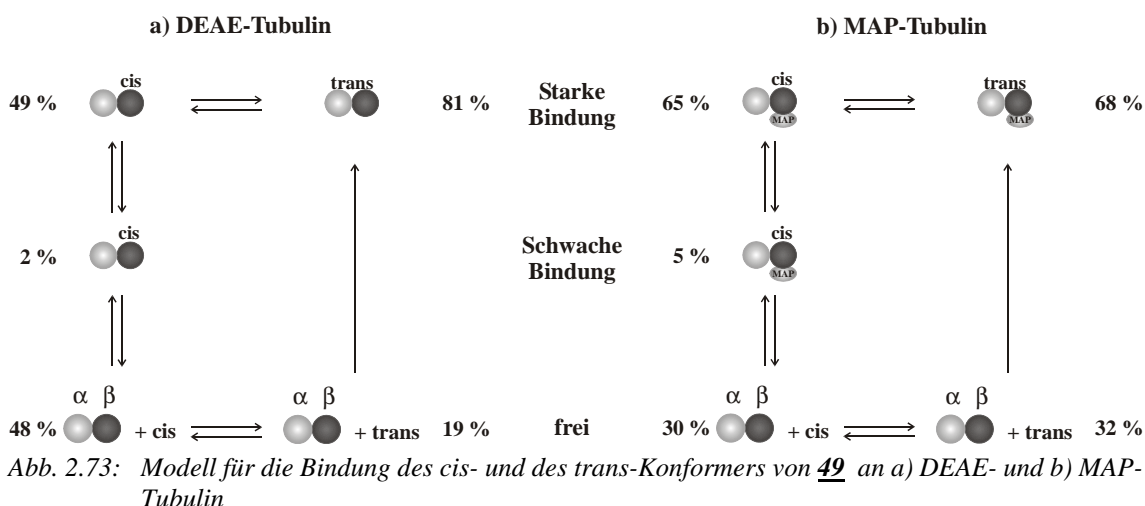
Signal	ohne Tubulin	DEAE-Tubulin
T	9.6 Hz	15.4 Hz
ST_1	10.0 Hz	16.4 Hz
ST_2	10.2 Hz	15.7 Hz
AT	10.6 Hz	17.2 Hz

Mit $r_{\text{HN}} = 101$ pm, $r_{\text{HH}} = 241$ pm und $\Delta\sigma_{\text{H}} = -16$ ppm erhält man eine Korrelationszeit von 2.9 ns für **49** in Gegenwart von MAP-Tubulin und 1.2 ns in Gegenwart von DEAE-Tubulin, welche von der Korrelationszeit der ungebundenen Verbindung **49** (328 ps) abweicht (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Effektive Korrelationszeiten von **49** mit und ohne DEAE-Tubulin und MAP-Tubulin

	τ_c
ohne Tubulin	328 ps
DEAE-Tubulin	1.2 ns
MAP-Tubulin	2.9 ns

Die effektiven Korrelationszeiten des cis-Konformers des Dolastatin 10-Derivates **49** in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin sind größer als die der Verbindung in Abwesenheit von Tubulin. Allerdings entsprechen sie nicht der Korrelationszeit eines Proteins von ca. 100 kDa, welche ca. 60 ns beträgt. Daraus kann man abschätzen, daß im Falle des DEAE-Tubulins 2 % und im Falle des MAP-Tubulins 5 % des cis-Konformers von **49** in Form eines schwach gebundenen Tubulin-Ligand-Komplexes vorliegen (Abb. 2.73), welcher zu den beobachteten Linienbreiteneffekten der Signale im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum (Abb. 2.71) führt. Im Gegensatz hierzu zeigen die Signale des trans-Konformers von **49** keine Linienverbreiterung, so daß hier eine schwache Wechselwirkung mit dem Tubulin ausgeschlossen werden kann.



Die beobachteten Signale des cis-Konformers in den Spektren in Gegenwart des Tubulins (Abb. 2.69 b) und c), Abb. 2.70 b) und c)) entsprechen dem freien Dolastatin 10-Derivat **49**, welches sich im schnellen Austausch mit einer gebundenen

Form am Tubulin befindet. Im Falle des MAP-Tubulins ist im gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum ein deutlicher TROSY-Effekt zu erkennen, während der cis-Gehalt im Vergleich zu der freien Verbindung **49** unverändert bleibt. Im Gegensatz hierzu findet man in Gegenwart von DEAE-Tubulin einen erhöhten Anteil des cis-Konformers von **49**, welcher aus einem schwach gebundenen Liganden resultiert. Dieser muß sich im Gleichgewicht mit einer gebundenen Form des trans-Konformers von **49** befinden.

Die unterschiedlichen Populationen des cis-Konformers von **49** in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin deuten hier im Gegensatz zu den Beobachtungen beim Colchicin darauf hin, daß in Gegenwart der MAPs die Energie des schwach und stark gebundenen Zustands abgesenkt wird.

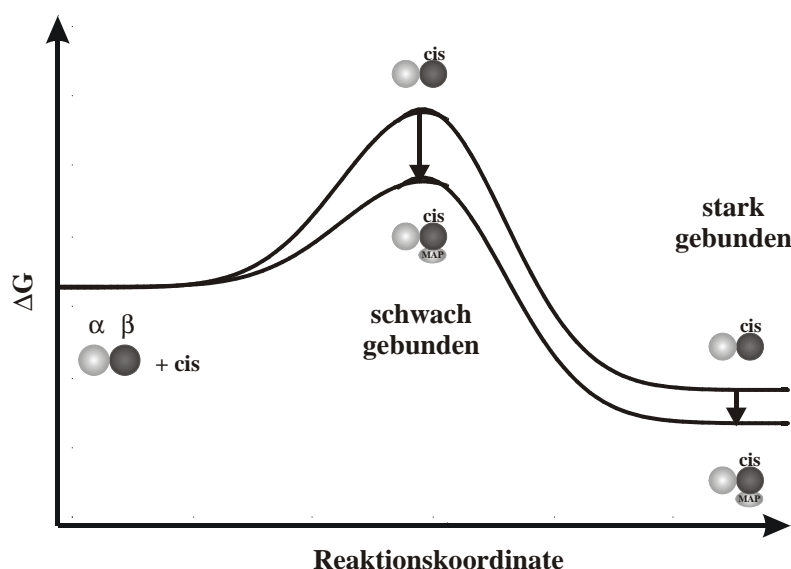


Abb. 2.74: Energieprofil der Bindung des cis-Konformers von **49** an DEAE- und MAP-Tubulin

Die beiden verwendeten Tubulin-Sorten (MAP- und DEAE-Tubulin) unterscheiden sich durch die für die Polymerisation wichtigen MAPs. Die MAPs binden an die beiden C-terminalen Helices (H11, H12) in der β -Untereinheit des Tubulins (Abb. 2.6 b)), welche sich in räumlicher Nähe der Bindungsstelle des Dolastatin 10 befinden [31]. Für die unterschiedlichen Beobachtungen bei DEAE- bzw. MAP-Tubulin können zwei

Erklärungen angeführt werden. Zum einen könnte durch die MAPs die Bindung des Dolastatin 10-Derivates **49** an die β -Untereinheit des Tubulins verstärkt werden. Zum anderen könnte das cis-Konformer von **49** die Wechselwirkung der MAPs mit dem Tubulin stören und so die Inhibition der Polymerisation hervorrufen.

2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel wurde die unterschiedliche Art der Bindung der Konformere von Dolastatin 10-Derivaten in Gegenwart von Tubulin sowohl durch *in vitro*-Studien als auch mit Hilfe von NMR-Spektroskopie vorgestellt. Zum einen wurden insgesamt sechs neue Dolastatin 10-Derivate **16a,b,c**, **35a,b** und **41** synthetisiert, welche auf ihr Verhalten bei der Tubulin-Polymerisation untersucht wurden. Es konnte gezeigt werden, daß die Verbindung **35a**, welche das cis-Konformer des Dolastatin 10 repräsentiert, einen kleineren IC₅₀-Wert bezüglich der Inhibition der Tubulin-Polymerisation als die lineare Verbindung **41** besitzt, welche die gleichen Modifikationen im Vergleich zum Dolastatin 10 besitzt. Daraus kann man schließen, daß die cis-Konformation des Dolastatin 10 für die Inhibition der Tubulin-Polymerisation verantwortlich ist. Durch diese neue Erkenntnis können neuartige Dolastatin 10-Derivate, welche dem cis-Konformer des Dolastatin 10 entsprechen, bezüglich ihrer Cytotoxizität gegenüber Krebszellen untersucht werden.

In einem zweiten Ansatz wurde das ¹⁵N-markierte lineare Dolastatin 10-Derivat **49** mit heteronuclearen zweidimensionalen NMR-Experimenten in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin untersucht. Durch die Bestimmung der Korrelationszeiten für das cis-Konformer der Verbindung in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin aus dem in beiden Dimensionen gekoppelten ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum konnte gezeigt werden, daß sich das cis-Konformer von **49** im schnellen Austausch mit der gebundenen Form

befindet. In Gegenwart von DEAE-Tubulin stellt man einen erhöhten cis-Gehalt von **49** fest, welcher auf eine schwache Bindung des Liganden hindeutet. Im Falle des MAP-Tubulins ist der Anteil des cis-Konformers von **49** im Vergleich zu der freien Verbindung nahezu unverändert. Durch die erhöhte Korrelationszeit des cis-Konformers von **49** in Gegenwart von MAP-Tubulin kann man eine zusätzliche Wechselwirkung mit den MAPs annehmen, welche eventuell die Bindung von **49** an die β -Untereinheit des Tubulins verstärkt. Außerdem könnte die Wechselwirkung der MAPs mit dem Tubulin durch den Liganden gestört werden.

Bei den entsprechenden Messungen mit ^{13}C -markiertem Colchicin in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin konnte ebenfalls ein schneller Austausch des Liganden mit der gebundenen Form nachgewiesen werden. Hierbei wurde aber kein unterschiedliches Verhalten bei den beiden Tubulin-Sorten festgestellt. Die Bindungsstelle des Colchicin an der β -Untereinheit des Tubulins unterscheidet sich von der des Dolastatin 10 (Abb. 2.12). Deshalb kann man hier zusätzliche Wechselwirkungen mit den MAPs ausschließen.

3 NMR-spektroskopische Untersuchungen zum Übergangszustand des Hammerhead Ribozyms

In diesem Kapitel werden die ersten Schritte zur Untersuchung des Übergangszustandes des Hammerhead Ribozyms mit Vanadat als Analogon für das zu spaltende Phosphat beschrieben. In den bisher existierenden Röntgenstrukturanalysen des Hammerhead Ribozyms wurde nur eine Konformation beobachtet, welche nicht dem postulierten Mechanismus der Reaktion entspricht.

3.1 Das Hammerhead Ribozym

Das Hammerhead Ribozym ist ein kleines katalytisches RNA-Motiv in viraler RNA, welches sequenzspezifisch RNA unter Bildung von einem 2',3'-zyklischen Phosphat und einer freien 5'-Hydroxylgruppe hydrolysiert [85]. Es spielt bei der Replikation der einzelsträngigen zirkulären RNA von Pflanzenviren eine zentrale Rolle, indem es die replizierte lineare RNA intramolekular spaltet [86].

Die Sekundärstruktur des Hammerhead Ribozyms (Abb. 3.1) besteht aus drei Watson-Crick basengepaarten Stems und einer hochkonservierten katalytischen *core*-Region, deren Basen nicht komplementär nach Watson-Crick sind.

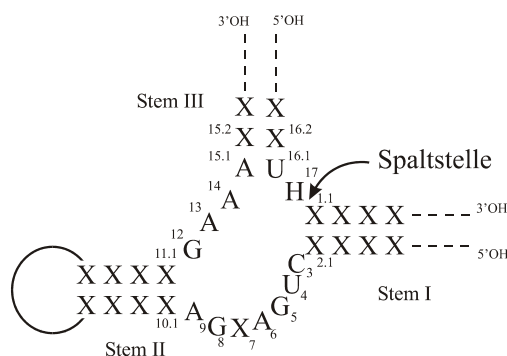


Abb. 3.1: Konsensussequenz des Hammerhead Ribozyms; X = A, U, C, G; H = A, U, C

Die weiteren strukturellen Eigenschaften des Hammerhead Ribozyms konnten durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden, indem im Substratstrang entweder Modifikationen z. B. *all*-DNA als Substrat (Abb. 3.2), eingeführt wurden, die die Hydrolyse verhindern [87,88] oder die Kristallisationsbedingungen eine Spaltung nicht erlaubten [89]. Trotz der verschiedenen Ribozymkonstrukte und Bedingungen erhielt man ähnliche Strukturen. Die Tertiärstruktur ähnelt einer Wüschelrute und die Ribose-Konformationen in den Stems befinden sich in der A-Form. Stem II und III sind nahezu coaxial und werden durch drei nicht-Watson-Crick-Basenpaare zwischen U₇-A₁₄, G₈-A₁₃ und A₉-G₁₂ stabilisiert. Neben dem Nucleotid 17 (A, U oder C) 3'-terminal zur Spaltstelle befinden sich noch weitere ungepaarte Nucleotide in dem sogenannten U-Turn C₃U₄G₅A₆.

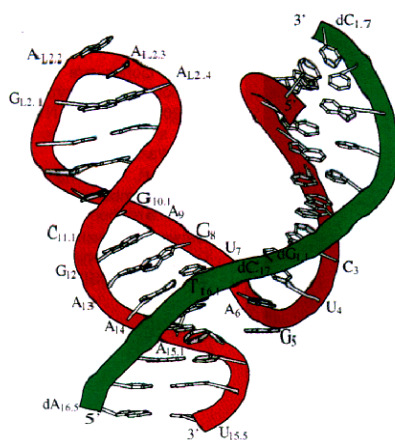


Abb. 3.2: Röntgenstruktur des Hammerhead Ribozyms mit DNA als Substratstrang; rot Ribozym, grün Substratstrang [87]

Der Mechanismus der Hydrolyse des Phosphodiesters 3'-terminal zum Nucleotid 17 verläuft nach dem *in line*-Mechanismus (Abb. 3.3) und benötigt mindestens ein zweiwertiges Metallion, welches *in-vivo* Magnesium ist [90]. Dieses bindet an das *pro-R* Sauerstoffatom des Phosphors in Form eines Hydroxids und deprotoniert die 2'-Hydroxygruppe des Nucleotids 17. Der Sauerstoff greift den Phosphor von der

gegenüber zur Abgangsgruppe liegenden Seite nucleophil an und bildet so einen penta-koordinierter Phosphorsäuretriester.

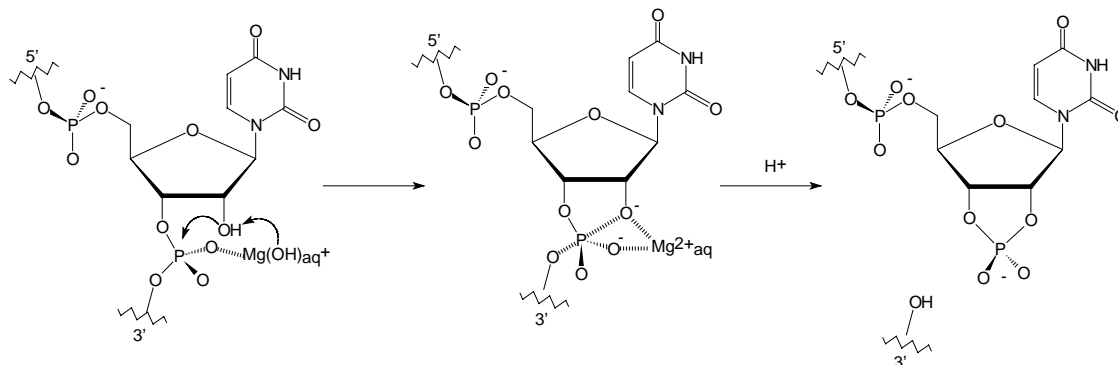


Abb. 3.3: Reaktionsmechanismus der RNA-Spaltung durch das Hammerhead Ribozym nach dem in line-Mechanismus [90]

Bei der anschließenden Hydrolyse entsteht 3'-terminal ein zyklischer 2',3'-Phosphorsäurediester und die freie 5'-Hydroxylgruppe. Bei dieser Reaktion ist das Ablösen den Substratstranges vom Ribozym der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

In den oben erwähnten Röntgenstrukturen befindet sich die angreifende 2'-Hydroxylgruppe am Nucleotid 17 nicht in der Position, um den beschriebenen Reaktionsmechanismus durchführen zu können [87, 88, 89]. Es muß eine starke konformationelle Änderung bei der Spaltreaktion im Phosphatrückgrat stattfinden. In einer zeit-aufgelösten Röntgenstrukturanalyse konnte eine entsprechende Konformation, die das Hammerhead Ribozym kurz vor dem Übergangszustand darstellen könnte, erhalten werden [91].

3.2 Vanadate

Als Vanadate bezeichnet man alle Vanadium(V)-oxy-anionen, die sich aus Vanadium-pentoxid V_2O_5 in wäßriger Lösung bilden können [92]. In stark alkalischer Lösung ($pH > 13$) bildet sich analog zu Phosphorpentoxid das farblose Salz M_3VO_4 der hypothetischen Orthovanadiumsäure H_3VO_4 . Bei Zugabe von Säure zu Vanadat-

lösungen erfolgt auf dem Wege über HVO_4^{2-} - im Gegensatz zu Phosphat - eine Kondensation unter Wasserabspaltung, wobei Salze von Polyvanadiumsäuren entstehen. Durch besondere Stabilität zeichnen sich dabei im pH-Bereich 8 - 13 die farblosen Monovanadate HVO_4^{2-} , Divanadate $\text{HV}_2\text{O}_7^{3-}$ und Metavanadate $(\text{VO}_3^-)_n$ aus, während im pH-Bereich 2 - 6 die orangefarbenen Decavanadate $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$, $\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$ und $\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{4-}$ existent sind. Die Mono-, Di- und Metavanadate VO_4^{3-} , $\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$ und $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ besitzen am Vanadium eine tetraedrische Sauerstoff-Umgebung. Das Decavanadat-Ion setzt sich aus zehn miteinander kondensierten kantenverknüpften VO_6 -Oktaedern zusammen.

Unter physiologischen Bedingungen liegt Vanadat im Vergleich zu Phosphat (HPO_4^{2-}) hauptsächlich in Form von H_2VO_4^- vor. Im Vergleich zu Phosphat kann es leichter seine Koordinationsgeometrie ändern. Die Vanadium-Sauerstoff-Bindung ist im Vergleich zur Phosphor-Sauerstoff-Bindung länger und weniger polar, so daß der Sauerstoff nur geringe Fähigkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken besitzt [93].

3.2.1 Biochemische Aspekte von Vanadat

Vanadat inhibiert viele Phosphat-metabolisierenden Enzyme [94], z. B. Na^+/K^+ -ATPase und RNasen. Seine Wirkung beruht auf seiner Fähigkeit, die Koordinationszahl leicht zu wechseln und/oder Heterooligomere mit Phosphaten bzw. Pyrophosphaten zu bilden. Bei Enzymreaktionen, in denen der Phosphor einen pentakoordinierten Übergangszustand durchläuft, kann Vanadat diesen stabilisieren. Außerdem bildet Vanadat spontan in wäßriger Umgebung zyklische Diester mit 1,2-cis-Diolen [95]. Bei zyklischen 1,2-cis-Diolen ist die Komplexbildung mit Vanadat stärker ausgeprägt. So ist die Bildungskonstante der Reaktion von Vanadat mit Adenosin ($4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) zum Beispiel 10^5 -fach größer als die mit Ethylenglykol [96].

Bei einer Kombination aus Röntgen- und Neutronenbeugungsstudien an einem ternären Komplex bestehend aus RNase A, Uridin und Vanadat konnte gezeigt werden, dass das Vanadium von fünf Sauerstoffen umgeben ist und als verzerrte trigonale Bipyramide vorliegt (Abb. 3.4). Der 2'-Sauerstoff der Ribose des Uridins befindet sich in apikaler Position [97].

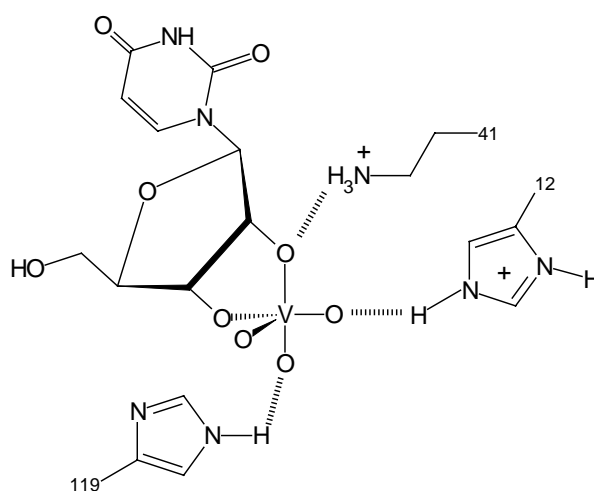


Abb. 3.4: Röntgen- und Neutronenbeugungsstudie des ternären Komplexes Vanadat/Uridin/RNase A [97]

Die RNase A spaltet ähnlich dem Hammerhead Ribozym einzelsträngige RNA nach einer Pyrimidin-Base. Im Gegensatz zum Hammerhead Ribozym wird die Reaktion anstatt von Magnesium-Ionen von den Imidazolseitenketten zweier Histidine im Protein katalysiert. Der Reaktionsmechanismus der RNA-Hydrolyse durchläuft analog einen pentakoordinierten Phosphor. Deshalb sollte es möglich sein, den Übergangszustand des Hammerhead Ribozyms ebenfalls durch Vanadat als Analogon für Phosphat untersuchen zu können.

3.2.2 Vanadat und NMR-Spektroskopie

Vanadium besteht zu 99.76 % aus dem NMR-aktiven ^{51}V -Kern mit Kernspin $7/2$, welcher durch seine relativ gute Empfindlichkeit (0.381) und geringes Quadrupolmoment ($Q = -0.052 \times 10^{-28} \text{ m}^2$) für ein Übergangsmetall schmale Linien im Spektrum

ergibt [98]. In der Linienbreite der Resonanzen spiegelt sich die Symmetrie der Koordinationssphäre am Vanadium wieder. So erhält man bei tetraedrisch koordinierten Vanadaten eine Linienbreite von 50 bis 200 Hz, während bei Symmetrierniedrigung durch oktaedrische Ligandanordnung oder durch Komplexbildung sehr breite Linien (mehrere Kilohertz) aufgrund quadrupolarer Relaxation beobachtet werden. Die ^{51}V -chemische Verschiebung speziell bei Vanadaten kann ebenfalls die Art und Anzahl der Liganden beschreiben [99].

In wässriger Lösung bildet Vanadat mehrkernige Oligomere, deren chemische Verschiebung von pH-Wert, Konzentration und Temperatur abhängig ist und zwischen -590 bis -425 ppm relativ zu Vanadiumoxytrichlorid liegt [100,101].

Vanadat kann ebenfalls Komplexe mit Amino- und Hydroxygruppen eingehen, welche im ^{51}V -NMR-Spektrum Anlaß zu einem ebenfalls breiten Signal mit ähnlicher chemischer Verschiebung wie der erwartete Komplex mit dem 1,2-cis-Diol geben können [102]. Außerdem bildet Vanadat mit Phosphaten bevorzugt Heterooligomere, welche nur zu einer Linienverbreiterung im ^{51}V -Spektrum und nicht zu dem gewünschten Komplexsignal führen [103].

3.3 NMR-Studien von Vanadat-Komplexen mit Nucleosiden und Nucleotiden

Vor den NMR-Studien von Vanadat in Gegenwart des Hammerhead Ribozyms sollte das Verhalten von Vanadat mit Nucleosiden und Nucleotiden untersucht werden, um mögliche Fehlerquellen auszuschließen, welche zu einer falschen Interpretation der ^{51}V -Spektren führen könnten.

Deshalb wurden an 1:1-Lösungen von 10 mM Vanadat mit jeweils 10 mM Uridin, 10 mM 5'-Uridinmonophosphat (5'-UMP), 10 mM Adenosin und 10 mM ApU, einem

Dinucleotid mit verknüpfendem 5',3'-Phosphorsäurediester, sowohl ^1H - als auch ^{51}V -Spektren bei 300 K aufgenommen.

Im Falle von Uridin, Adenosin und ApU (Abb. 3.5) konnten im ^1H -Spektrum neben den nicht komplexierten Verbindungen auch zwei bis vier neue Signale im H1'-Bereich beobachtet werden, welches auf die Bildung von unterschiedlichen Vanadat-Komplexen mit den Nucleosiden und dem Nucleotid hindeutet.

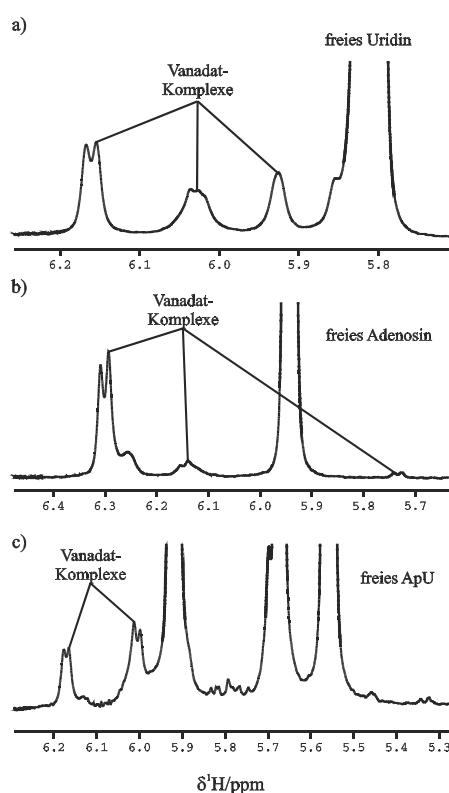


Abb. 3.5: $\text{H1}'$ -Region der Vanadat-Komplexe mit a) Uridin, b) Adenosin und c) ApU im Verhältnis 1:1 bei 300 K

Im ^1H -Spektrum des 5'-UMP in Gegenwart von Vanadat wurden keine zusätzlichen Signale beobachtet, weil hier wahrscheinlich die Heterooligomerenbildung mit der Phosphatgruppe des 5'-UMP bevorzugt wurde [103].

Bei dem Haupt-Komplex von Vanadat mit Uridin und Adenosin handelt es sich um zweikernige Vanadat-Oligomeren, welche von zwei Liganden umgeben sind (Abb. 3.6).

Dies konnte zum einen durch kinetische Studien der Komplexbildung [96] als auch

durch eine Röntgenstruktur von Adenosin mit Vanadat mit anschließender NMR-spektroskopischer Untersuchung des Kristalls in Lösung [104] gezeigt werden.

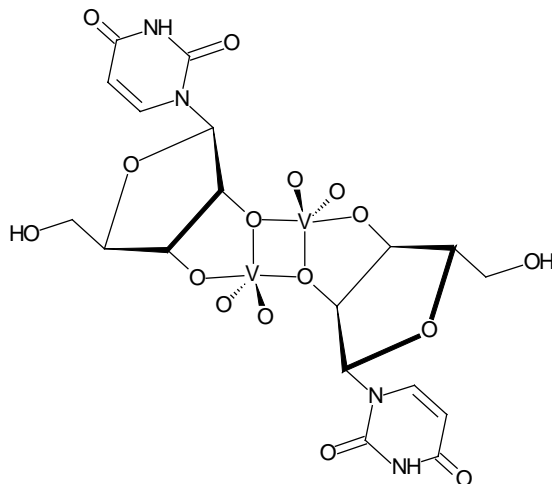


Abb. 3.6: Strukturvorstellung des Uridin-Vanadat-Komplexes in Anlehnung an [104]

Die Vanadium-Atome sind in Form von verzerrten trigonalen Bipyramiden komplexiert und bilden einen zyklische Diester mit dem 2',3'-cis-Diol der Ribose im Nucleosid. Der Komplex besitzt C_2 -Symmetrie. Die niederpopulierten Komplexe, welche ebenfalls im ^1H -Spektrum beobachtet wurden, könnten durch Rotation eines Nucleosids um 180° in der Ebene des 2',3'-cis-Diols und/oder durch die Bildung eines 1:1-Komplexes von Vanadat mit einem Nucleosid resultieren.

Durch weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen in Form von DQF-COSY, TOCSY mit einer Mischzeit von 70 ms und NOESY mit einer Mischzeit von 500 ms konnten die ^1H -chemischen Verschiebungen der Komplexe von Vanadat mit Uridin ermittelt werden (Tabelle 3.1). Die meisten der Resonanzen sind im Vergleich zu Uridin zu tiefem Feld verschoben. Den größten Effekt beobachtet man am H2' und H3' der Ribose, an deren Hydroxy-Gruppen das Vanadat komplexiert ist.

Tabelle 3.1: ^1H -chemische Verschiebungen der Uridin-Vanadat-Komplexe im Vergleich zu Uridin, AMX400, 300 K

	Uridin	Komplex 1	Komplex 2	Komplex 3
H5	7.76	7.65	7.71	7.65
H6	5.79	5.84	5.80	5.84
H1'	5.84	5.93	6.17	6.00
H2'	4.26	4.86	4.82	4.96
H3'	4.14	4.71	4.64	4.84
H4'	4.04	4.23	4.38	nd
H5'	3.83	3.76	3.98	nd
H5''	3.72	3.64	3.87	nd

Im NOESY kann man Austausch zwischen den Komplexen 2 und 3 im Rahmen der NMR-Zeitskala beobachten, während der Komplex 1, der Hauptkomplex, keinerlei Austauschsignale zu den anderen beiden Komplexen zeigt.

In dem ^{51}V -Spektrum der 1:1-Vanadat-Nucleosid/Nucleotid-Lösungen (Abb. 3.7) wurde die Bildung der Komplexe durch das Auftreten eines breiten Signals bei -523 ppm im Falle von Uridin, Adenosin und ApU beobachtet, welches mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen übereinstimmt [96,104]. Die relativ schmalen Signale bei -572 , -569 und -556 ppm resultieren von tetraedrisch koordinierten Vanadaten, welche zum Teil als Dimere und Tetramere vorliegen [98]. Durch die hohe Symmetrie der Koordinationssphäre um das Vanadium besitzen die Resonanzen eine deutlich geringere Linienbreite, als die Signale bei -512 und -498 ppm, die von Decavanadaten stammen und eine oktaedrische Symmetrie am Vanadium besitzen. Durch die Komplexbildung von Vanadat mit Uridin, Adenosin und ApU wird die Symmetrie am Vanadium noch weiter herabgesetzt, so daß breitere Resonanzen im Spektrum resultieren.

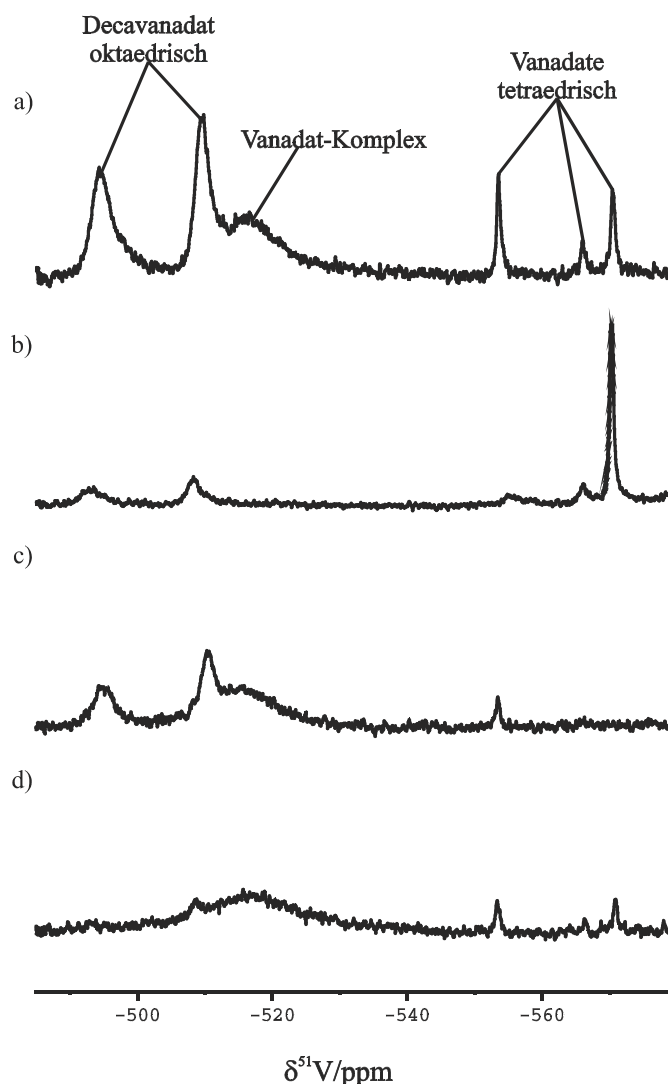


Abb. 3.7: ^{51}V -Spektrum der Vanadat-Komplexe mit a) Uridin, b) 5'-UMP, c) Adenosin und d) ApU im Verhältnis 1:1 bei 300 K

Wie schon im ^1H -Spektrum von Vanadat mit 5'-UMP war auch im ^{51}V -Spektrum keine Komplexbildung zu beobachten.

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen an den Nucleosiden Uridin und Adenosin konnte gezeigt werden, daß Vanadat mit vicinalen cis-Diolen zyklische Diester bildet. Außerdem wird die Komplexbildung nicht durch die Anwesenheit von Phosphorsäurediestern beeinflusst, wie im Falle von ApU gezeigt wurde. Allerdings sollte auf terminale 5'- oder 3'-Phosphatgruppen bei dem Design der RNA-Konstrukte für die Untersuchungen von Vanadat in Gegenwart des Hammerhead Ribozyms verzichtet werden.

3.4 NMR-Studien von Vanadat-Komplexen mit ternären RNA-Konstrukten

Für die NMR-spektroskopischen Studien von Vanadat in Gegenwart von Hammerhead Ribozym wurde die Sequenz von Simorre *et al.* [105] verwendet, mit der er NMR-spektroskopisch das Hammerhead Ribozym sowohl im nicht-gespaltenen als auch im gespaltenen Zustand untersuchte. Um Vanadat anstelle des zu spaltenden Phosphates als Übergangszustandsanalogon verwenden zu können, wird ein ternärer Komplex bestehend aus einem 34mer, 6mer und 8mer eingesetzt (Abb. 3.8), bei dem das Phosphat zwischen Nucleotid 17 und 1.1 fehlt.

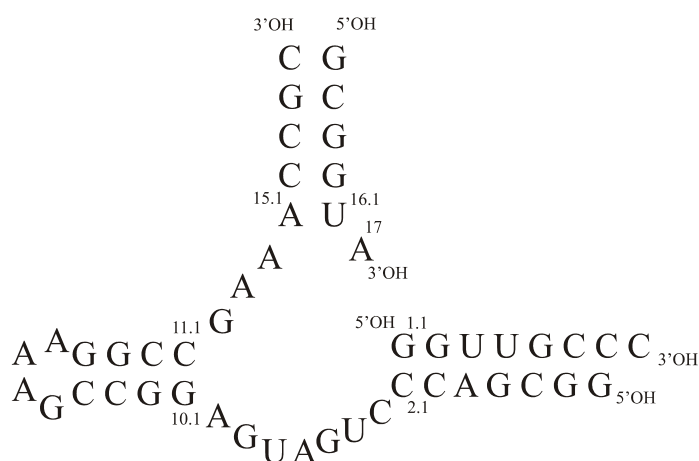


Abb. 3.8: Sequenz des verwendeten ternären RNA-Komplexes

Aus den gewonnenen Erkenntnissen der NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Vanadat mit Nucleosiden/Nucleotiden wurden folgende ternäre RNA-Komplexe für die Komplexbildungsstudien in Gegenwart von Vanadat verwendet (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Verwendete RNA-Konstrukte

Nr.	34mer	8mer	6mer
1	all-RNA	all-RNA	all-RNA
2	3'-(2'-desoxy)-Ende	3'-(2'-desoxy)-Ende	all-RNA
3	3'-(2'-desoxy)-Ende	3'-(2'-desoxy)-Ende	3'-(2'-desoxy)-Ende
4	3'-(2'-desoxy)-Ende	3'-(2'-desoxy)-Ende 5'-Phosphat	3'-(2'-desoxy)-Ende

Bei den RNA-Konstrukten Nr. 1 und 2 befindet sich an der Spaltstelle, dem A₁₇, eine Ribose-Einheit, mit der das Vanadat einen Komplex eingehen kann. Weil Vanadat natürlich auch an den verbleibenden freien 2',3'-Hydroxylgruppen der 3'-Enden koordinieren kann, wurden bei dem RNA-Konstrukt Nr. 2 bei dem 34mer und 8mer 3'-terminal 2'-desoxy-Nucleotide verwendet. Die RNA-Konstrukte Nr. 3 und 4 sollten mit Vanadat keine Komplexe ergeben, weil sie keine 3'-terminalen Ribose-Einheiten sondern 2'-desoxy-Ribose-Einheiten besitzen. Mit Hilfe dieser beiden Konstrukte soll gezeigt werden, daß die Wechselwirkung von Vanadat mit dem Hammerhead Ribozym aus einer spezifischen Bindung an der Spaltstelle resultiert und nicht durch eine Koordination an einer anderen Stelle in dem ternären Komplex.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden bei 277 K und pH 6.0 an einer 100 µM RNA-Probe, bestehend aus äquimolaren Mengen 34mer, 8mer und 6mer, sowie 10 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl zunächst ohne Vanadat durchgeführt und anschließend nach Zugabe von 10 mM Vanadat-Lösung, pH 6.0, die Veränderung im Iminobereich des 1D-*jump-and-return-echo*-Spektrums und des 2D-*jump-and-return-echo*-NOESY [106] beobachtet. Außerdem wurden ⁵¹V-Spektren aufgenommen, weil hier eine eindeutige Aussage über die Komplexbildung gemacht werden kann.

Im ⁵¹V-Spektrum der RNA-Konstrukte Nr. 1 und 2 (Abb. 3.9) sieht man bei -525 ppm hochfeldig zu den Decavanadat-Signalen ein breites Signal, welches die Entstehung eines Vanadat-RNA-Komplexes darstellt. Die chemische Verschiebung dieses Signals entspricht der der in Kapitel 3.2.2 beobachteten Vanadat-Nucleosid-Komplexe, so daß von der Bildung eines zyklischen Vanadat-Diesters mit den 3'-terminalen cis-Diolen ausgegangen werden kann.

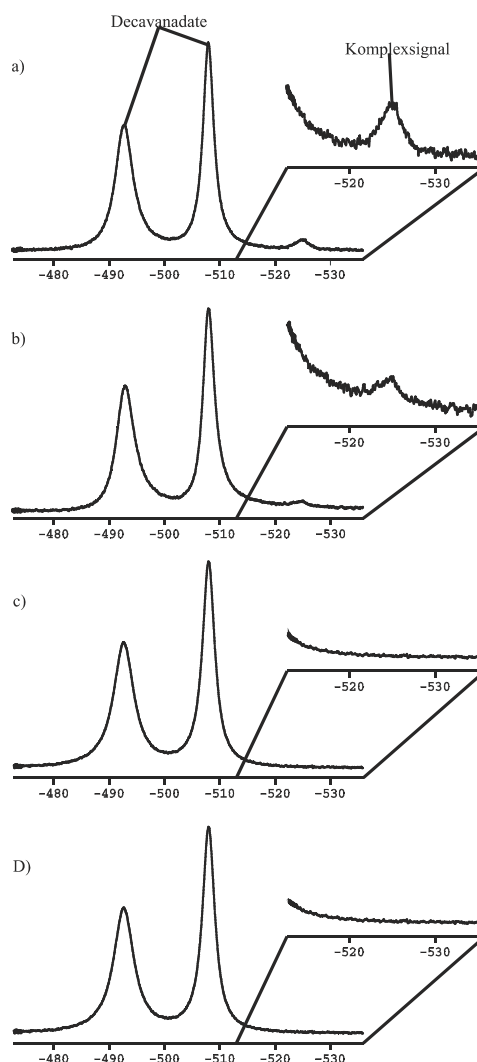


Abb. 3.9: ^{51}V -Spektrum in Gegenwart von 100 Äquivalenten Vanadat mit den RNA-Konstrukten a) Nr.1, b) Nr.2, c) Nr.3, d) Nr.4. Das Integral des Komplexsignals von Nr.1 ist dreimal so groß wie das von Nr.2.

Das Integral des Komplexsignals im Falle des RNA-Konstruktes Nr. 1 mit insgesamt drei möglichen Koordinationsstellen für das Vanadat ist um den Faktor drei größer als das im Falle des RNA-Konstruktes Nr. 2. Dies deutet darauf hin, daß das Vanadat sich am Nucleotid A₁₇ befindet. Im Falle der RNA-Konstrukte Nr. 3 und 4 wurde keine Komplexbildung beobachtet, so daß eine unspezifische Bindung des Vanadats an das Hammerhead Ribozym ausgeschlossen werden kann.

Im Iminobereich des 1D-*jump-and-return-echo*-Spektrums (Abb. 3.10) und dem 2D-*jump-and-return-echo*-NOESY wurden keine signifikanten Änderungen festgestellt. Man beobachtet eine Verstärkung der Iminosignale von U1.4 und G2.4, welche sich in

Stem I befinden. Dies deutet auf eine Stabilisierung der Basenpaare des Stems I in Gegenwart von Vanadat hin.

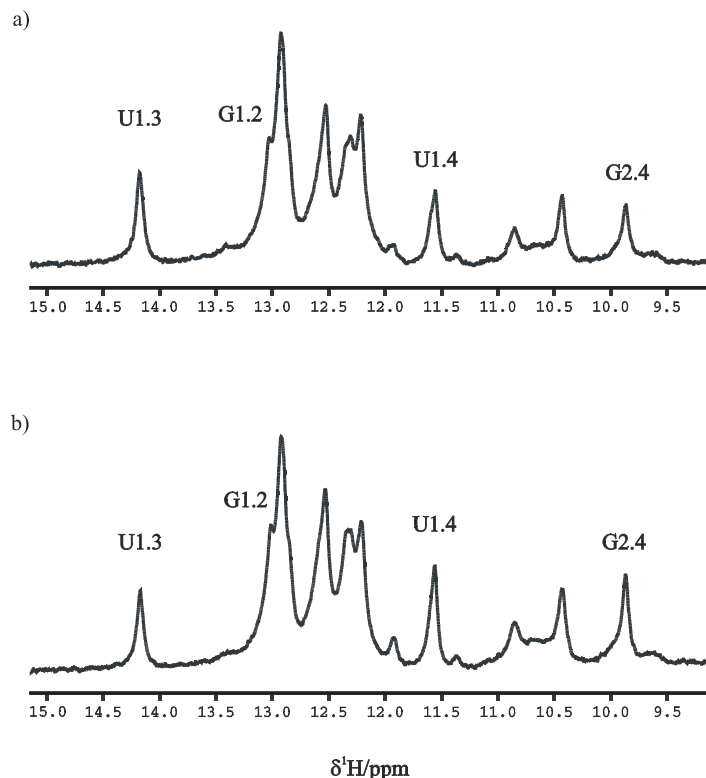


Abb. 3.10: Iminobereich der 1D-Jump-and-Return-echo-Spektren des RNA-Konstrukts Nr. 2; a) ohne Vanadat, b) mit 100 eq. Vanadat

Der Iminobereich von RNA-Spektren ist ein Indikator für basengepaarte Protonen, welche sich im Falle des Hammerhead Ribozyms in den drei Stems befinden. Bei der Spaltreaktion des Hammerhead Ribozyms finden die größten konformationellen Änderungen in der nicht basengepaarten *core*-Region statt und die drei Stems ändern ihre Orientierung relativ zueinander [107]. Deshalb sind im Iminobereich nur geringe Änderungen zu erwarten.

Aus den NMR-spektroskopischen Studien von Vanadat mit unterschiedlichen ternären RNA-Komplexen, welche die Sekundärstruktur des Hammerhead Ribozyms wiedergeben, konnte in den Fällen eine Koordination des Vanadats an das 3'-terminale cis-Diol des 6mers beobachtet werden, in denen es das Konstrukt auch zuließ. Bei den Konstrukten, welche am 3'-Ende des 6mers eine 2'-desoxy-Ribose besitzen, konnte keine

Komplexbildung festgestellt werden. In Tabelle 3.3 sind die Beobachtungen der Untersuchungen zusammengefaßt.

Tabelle 3.3: RNA-Konstrukte und beobachtete Komplexbildung

Nr.	34mer	8mer	6mer	Komplexbildung
1	all-RNA	all-RNA	all-RNA	+
2	3'-(2'-desoxy)- Ende	3'-(2'-desoxy)- Ende	all-RNA	+
3	3'-(2'-desoxy)- Ende	3'-(2'-desoxy)- Ende	3'-(2'-desoxy)- Ende	-
4	3'-(2'-desoxy)- Ende	3'-(2'-desoxy)- Ende 5'-Phosphat	3'-(2'-desoxy)- Ende	-

Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Vanadat als Übergangszustandsanalogon für Phosphat bei der Spaltreaktion des Hammerhead Ribozyms eingesetzt werden kann.

Ob die 5'-Hydroxygruppe des 8mers sich ebenfalls am Vanadat befindet, konnte mit diesen Untersuchungen nicht geklärt werden. Um diese Frage zu klären, müßten selektiv in einzelne interessante Nucleotide ^{13}C - und/oder ^{15}N -Markierungen eingeführt werden, um diese Bereiche gesondert betrachten zu können. So wäre es interessant, die konformationelle Änderung des Ribose-Rings im A_{17} mit ^{13}C -Markierung in der Ribose NMR-spektroskopisch zu untersuchen. In den Röntgenstrukturen [87,88] konnte man nur eine Ribose-Konformation finden, welche den postulierten *in line*-Mechanismus der Spaltreaktion nicht wiedergibt. Mit Hilfe von Vanadat im Komplex mit dem Hammerhead Ribozym könnte die Konformation der Ribose am A_{17} im Übergangszustand ermittelt werden. Außerdem könnte die Koordination der 5'-Hydroxylgruppe am $\text{G}_{1,1}$ durch ^{13}C -Markierung in der Ribose mit einem ^{13}C -gefilterten NOESY-Spektrum nachgewiesen werden.

4 NMR-spektroskopische Untersuchung der Struktur von Phospholamban

4.1 Einleitung

Phospholamban ist ein integrales Membranprotein des sarkoplasmatischen Retikulums im Herzmuskel. Das sarkoplasmatische Retikulum ist ein intrazelluläres Membranorganell, welches die Muskelfasern wie ein Netzwerk umgibt und den Nervenimpuls für die Muskelkontraktion an diese weiterleitet [17]. Auf molekularer Ebene löst der Nervenimpuls die schnelle Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen durch Calcium-Kanäle aus dem sarkoplasmatischen Retikulum mittels Diffusion in das Cytosol der Muskelfasern aus und der Muskel kontrahiert (Abb. 4.1). Das schnelle Entfernen der Ca^{2+} -Ionen durch die membranständige Ca^{2+} -ATPase unter ATP-Hydrolyse bewirkt die Relaxation des Muskels [108].

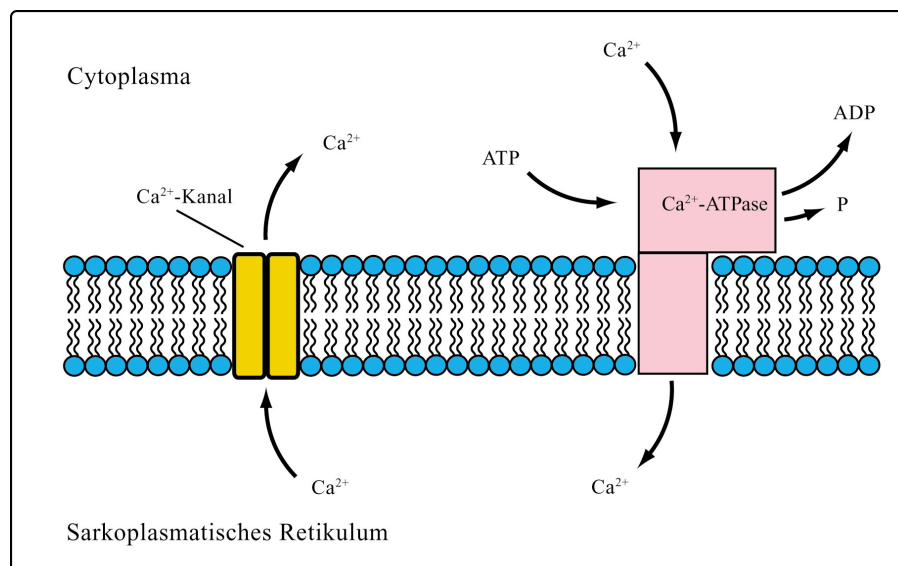


Abb. 4.1: Ca^{2+} -Transport durch die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums

Für diesen schnellen Wechsel der Ca^{2+} -Ionenkonzentration ist Phospholamban ein wichtiges regulatorisches Protein, welches direkt an die Ca^{2+} -ATPase bindet. In seinem

An die Ca^{2+} -ATPase bindet Phospholamban im monomeren Zustand, welcher im Gleichgewicht zu Oligomeren ($n = 5-7$) steht [114]. Es wird vermutet (Abb. 4.3), daß die drei positiven Überschußladungen im cytoplasmatischen Teil des Phospholambans mit der Phosphorylierungsstelle der Ca^{2+} -ATPase in Wechselwirkung treten [111]. Bei Phosphorylierung des Phospholambans an Ser16 oder Thr17 wird die Ladung um zwei erniedrigt und die inhibitorische Assoziation mit der Ca^{2+} -ATPase wird aufgelöst. Im phosphorylierten Zustand neigt Phospholamban zu höheren und stabileren Oligomeren ($n = 9-11$) [114].

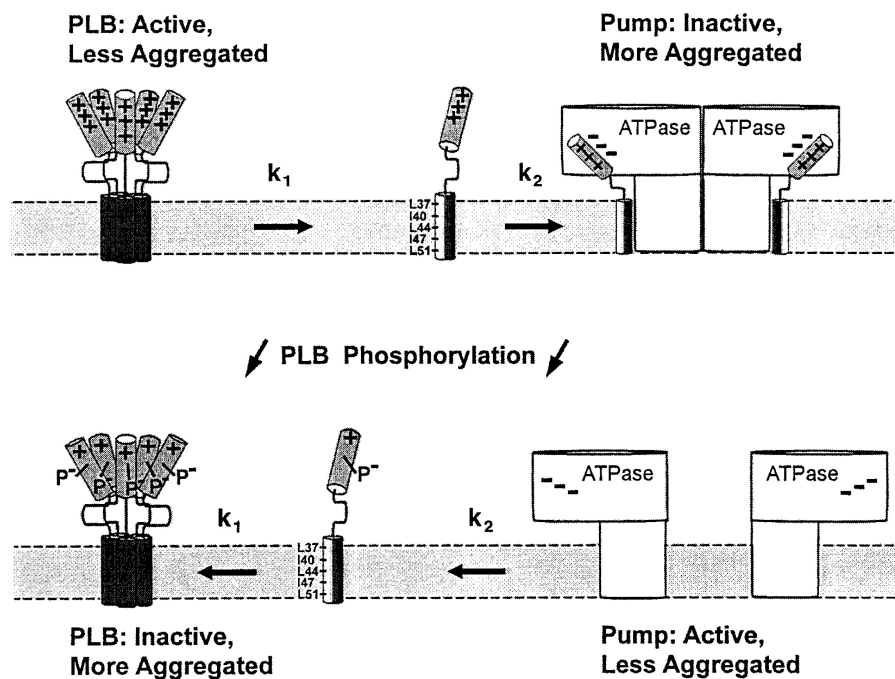


Abb. 4.3: Modell der Bindung von Phospholamban an die Ca^{2+} -ATPase [114]

In CD-Spektrum in Wasser und 0.075 % C_{12}E_8 (n-Dodecyl-Octaethylenglykol-Monoether) oder in organischen Lösungsmitteln (z.B. Methanol, Trifluorethanol und Hexafluorisopropanol) zeigt Phospholamban einen hohen Anteil von α -helikaler Sekundärstruktur [112]. Bei FT-IR-spektroskopischen Untersuchungen wurde auch ein geringer Anteil von β -Faltblatt postuliert, welches sich an der Cytosol-Membran-Grenzfläche (Aminosäuren 24-32) ausbildet [115]. Sowohl für den cytoplasmatischen Teil als auch den membranständigen Teil werden α -Helices vorhergesagt. NMR-spektroskopi-

sche Untersuchungen von cytoplasmatischen Fragmenten (Aminosäuren 1-25 und Aminosäuren 1-36) in 30 % Trifluorethanol/Wasser zeigen eine deutlich α -helikale Struktur des Phospholambans in dem Bereich der Aminosäuren 1-17 [116,117]. Der Bereich zwischen den beiden Helices (Aminosäuren 17-22) bleibt trotz vorliegender mittelreichweitiger NOE-Kreuzsignale im NOESY-Spektrum undefiniert.

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde die Mutante C41F verwendet (Abb. 4.2 b)), die als Monomer vorliegt und eine vergleichbare biologische Aktivität wie natives Phospholamban besitzt [118]. Das Protein wurde von Herrn Dr. Holger Schmid (ETH Zürich) an der festen Phase synthetisiert [112]. Als Lösungsmittel wurde Chloroform/Methanol (1:1, v/v) verwendet, das die Membranumgebung bei amphiphilen Molekülen nachahmt [119].

4.2 NMR-spektroskopische Untersuchung von Phospholamban

4.2.1 NMR-Spektroskopie

Die ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren wurden an einer ca. 1 mM Lösung von Phospholamban (C41F) in dem Lösungsmittelgemisch $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ (1:1, v/v) durchgeführt. DQF-COSY- [120], TOCSY- [121] mit 30, 50 und 70 ms Mischzeit und NOESY-Spektren [122] mit 100 und 150 ms Mischzeit wurden an Bruker DRX600 und DRX800 Spektrometern mit der States-TPPI-Methode [123] zur phasensensitiven Detektion bei 300 K aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu dem Signal der Hydroxylgruppe des Methanols bei 4.9 ppm gemessen. Bei allen Spektren wurde das verbleibende Lösungsmittelsignal durch Vorsättigung oder durch Anwendung von Gradienten (WATERGATE) [124] reduziert. Die Spektren wurden mit dem Programm UXNMR, Version 2.5, der Firma Bruker (Rheinstetten) unter Verwen-

dung einer quadratischen Sinus-Funktion als Window-Funktion in der indirekten Dimension prozessiert und basislinienkorrigiert.

4.2.2 Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebung

Die ^1H -chemischen Verschiebungen der Aminosäuren von Phospholamban (C41F) wurden anhand des DQF-COSY-Spektrums und der TOCSY-Spektren nach Standardprozeduren [125] mit dem Programm Felix, Version 98 (MSI, San Diego), ermittelt. Weil viele der $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}_{\alpha}$ -Kreuzsignale im DQF-COSY-Spektrum nur schwach zu erkennen waren, wurde ein 30 ms-TOCSY-Spektrum für die Zuordnung dieser Resonanzen herangezogen. Wegen des hohen Anteils an Leucinen und Isoleucinen kam es zu sehr starken Überlagerungen der Signale.

Die nur einmal vorhandenen Aminosäuren Asp2, Lys3, Tyr6 und Pro21 konnten eindeutig festgelegt werden. Im Falle von Asp2, Lys3 und Pro21 wurde das für diese Aminosäuren typische Spinsystem im DQF-COSY-Spektrum gefunden und im Falle des Tyr6 konnte leicht die aromatische Seitenkette im 800 MHz NOESY-Spektrum erkannt werden. Die Spinsysteme der verbleibenden Aminosäuren konnten zwar identifiziert werden, aber für die eindeutige Zuordnung musste auf die sequenzielle Information des 800 MHz NOESY-Spektrums zurückgegriffen werden.

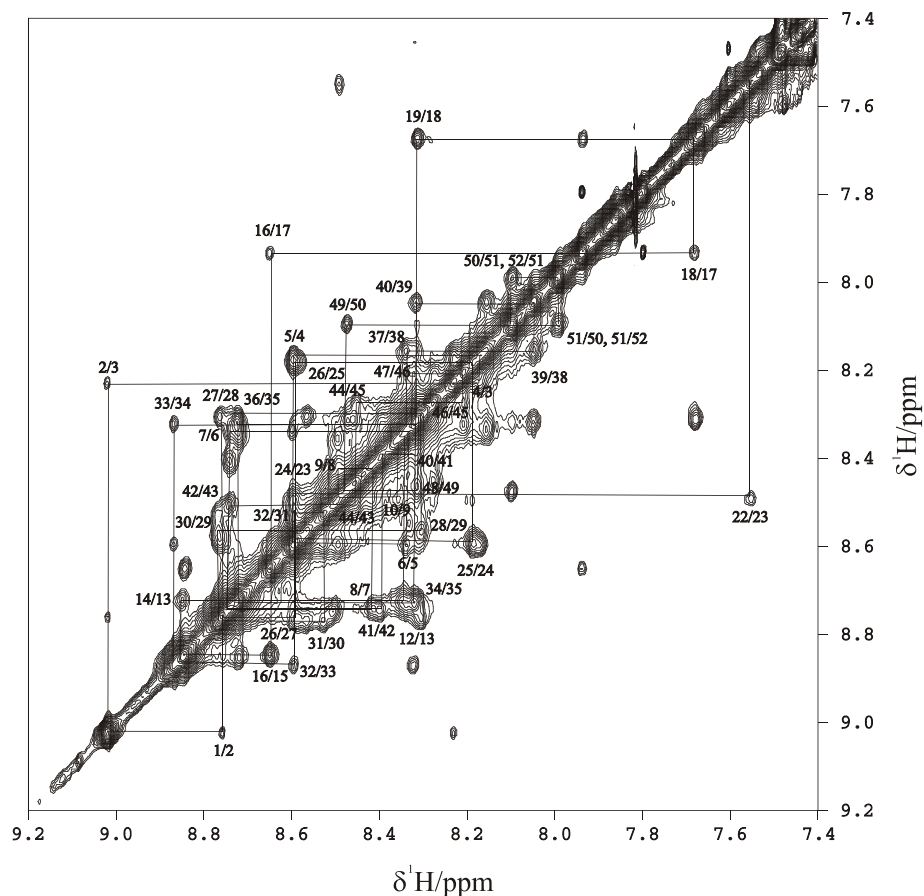


Abb. 4.4: H^N - H^N -Bereich im WATERGATE-NOESY, $\tau_m = 150$ ms, 300 K, DRX800. Sequentielle NOEs sind gezeigt. Die erste Zahl entspricht der H^N -Resonanz in ω_1 , die zweite der H^N -Resonanz in ω_2 .

Ausgehend von den vier gefundenen Aminosäuren wurden fast alle Spinsysteme mit Hilfe der Analyse der sequentiellen H_α - $H^N(i,i+1)$ - und H^N - $H^N(i,i+1)$ -Kreuzsignale ermittelt (Abb. 4.4). Die Ausnahme bildeten Ser10, Arg14, Met20, Cys36 und Ile47, weil sie mit den darauffolgenden Aminosäuren in der H^N -chemischen Verschiebung überlagerten. Allerdings konnten sie anhand ihres Spinsystemmusters und entsprechender H_α - $H^N(i,i+3)$ - und H_α - $H^N(i,i+4)$ -NOE-Kreuzsignale eindeutig zugeordnet werden (Abb. 4.5).

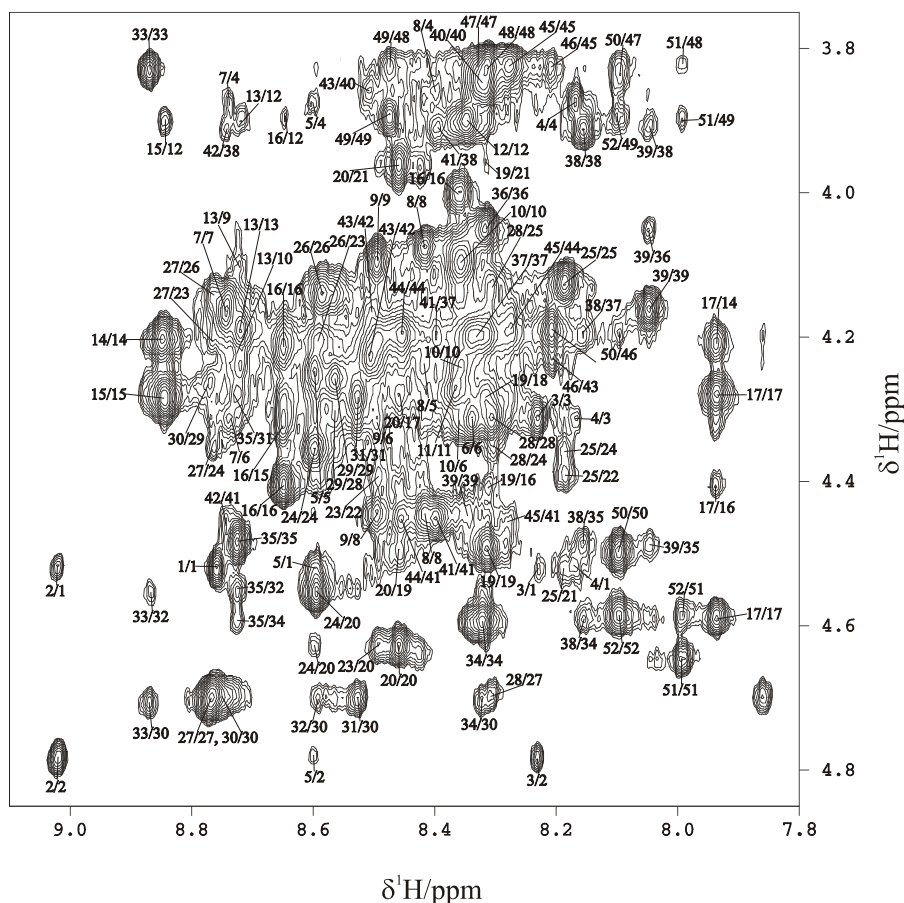


Abb. 4.5: Fingerprint-Bereich im WATERGATE-NOESY, $\tau_m = 150$ ms, 300 K, DRX800. Die $H_\alpha H^N$ -, $H_\alpha H^N(i,i+1)$ -, $H_\alpha H^N(i,i+3)$ - und $H_\alpha H^N(i,i+4)$ -Kreuzsignalen sind gezeigt. Die erste Zahl entspricht der H_α -Resonanz in ω_1 , die zweite der H^N -Resonanz in ω_2 .

Die Zuordnung von Phospholamban (C41F) in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ ist in Tabelle 4.1 aufgeführt. Die Zuordnung der diastereotopen H_β -Protonen erfolgte aus der Analyse der zehn berechneten Strukturen.

Insgesamt konnten nur fünf $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten anhand der Feinstruktur des COSY-Kreuzsignales nach der Methode von Titman und Keeler [126] bestimmt werden. Hierbei wird der Effekt der Linienbreite des Antiphase-Kreuzsignales im DQF-COSY-Spektrum durch Vergleich mit der Linienbreite im NOESY-Spektrum berücksichtigt. In der *fingerprint*-Region des DQF-COSY-Spektrums fehlen viele Kreuzsignale aufgrund von kleinen Kopplungskonstanten (< 4 Hz) oder Überlagerung der Kreuzsignale.

Tabelle 4.1: ^1H -chemische Verschiebung von Phospholamban (C41F) in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ (1:1, v/v)

Aminosäure	H^{N}	H_{α}	H_{β}	Andere
Met 1	8.76	4.45	2.22 (<i>pro-S</i>), 2.28 (<i>pro-R</i>)	H_{γ} 2.83, 2.77
Asp 2	9.02	4.68	3.16 (<i>pro-R</i>), 3.03 (<i>pro-S</i>)	
Lys 3	8.10	4.24	2.08 (<i>pro-R</i>), 2.21 (<i>pro-S</i>)	H_{γ} 1.82, 1.68, H_{δ} 1.89, H_{ϵ} 3.12
Val 4	8.08	3.82	2.42	H_{γ} 1.28, 1.16
Gln 5	8.53	4.20	2.43	H_{γ} 2.67, 2.54, H_{ϵ} 7.55, 6.75
Tyr 6	8.28	4.27	3.31	H_{δ} 7.17, H_{ϵ} 6.89
Leu 7	8.66	4.10	2.12 (<i>pro-S</i>), 1.79 (<i>pro-R</i>)	H_{δ} 1.15
Thr 8	8.36	4.02	4.39	H_{γ} 1.41
Arg 9	8.44	4.15	1.99 (<i>pro-S</i>), 2.15 (<i>pro-R</i>)	H_{γ} 1.80, H_{δ} 3.36, H_{ϵ} 7.78
Ser 10	8.30	4.20	4.05 (<i>pro-S</i>), 3.96 (<i>pro-R</i>)	
Ala 11	8.31	4.21	1.76	
Ile 12	8.28	3.85	2.12	H_{γ} 1.74, H_{δ} 1.03
Arg 13	8.66	4.10	2.13	H_{γ} 2.08, 1.78, H_{δ} 3.37, H_{ϵ} 7.81
Arg 14	8.79	4.16	2.14	H_{γ} 2.05, 1.85, H_{δ} 3.34, H_{ϵ} 7.52
Ala 15	8.78	4.23	1.74	
Ser 16	8.59	4.36	4.26 (<i>pro-S</i>), 4.16 (<i>pro-R</i>)	
Thr 17	7.88	4.22	4.53	H_{γ} 1.52
Ile 18	7.62	4.24	2.18	$\text{H}_{\gamma 1}$ 1.88, $\text{H}_{\gamma 2}$ 1.15, H_{δ} 1.46
Glu 19	8.24	4.44	2.38 (<i>pro-S</i>), 2.31 (<i>pro-R</i>)	H_{γ} 2.73, 2.64
Met 20	8.40	4.58	2.56 (<i>pro-R</i>), 2.34 (<i>pro-S</i>)	H_{γ} 2.97, 2.79
Pro 21		4.47	2.49 (<i>pro-S</i>), 2.04 (<i>pro-R</i>)	H_{γ} 2.45, 2.15, H_{δ} 3.91
Gln 22	7.51	4.34	2.41 (<i>pro-R</i>), 2.35 (<i>pro-S</i>)	H_{γ} 2.66, 2.61, H_{ϵ} 7.75, 6.86
Gln 23	8.43	4.16	2.43 (<i>pro-R</i>), 2.34 (<i>pro-S</i>)	H_{γ} 2.55, H_{ϵ} 7.46, 6.66
Ala 24	8.53	4.30	1.70	
Arg 25	8.12	4.07	2.21 (<i>pro-S</i>), 2.14 (<i>pro-R</i>)	H_{γ} 1.93, 1.83, H_{δ} 3.44
Gln 26	8.53	4.10	2.35 (<i>pro-S</i>), 2.29 (<i>pro-R</i>)	H_{γ} 2.54, 2.42, H_{ϵ} 7.26, 6.83
Asn 27	8.70	4.64	3.22 (<i>pro-R</i>), 2.88 (<i>pro-S</i>)	H_{δ} 7.61, 6.95
Leu 28	8.25	4.25	2.04 (<i>pro-R</i>), 1.88 (<i>pro-S</i>)	H_{δ} 1.09
Gln 29	8.51	4.21	2.45 (<i>pro-R</i>), 2.35 (<i>pro-S</i>)	H_{γ} 2.64, 2.53, H_{ϵ} 7.49, 6.76
Asn 30	8.71	4.65	3.25 (<i>pro-R</i>), 2.95 (<i>pro-S</i>)	H_{δ} 7.79, 6.84
Leu 31	8.48	4.70	2.20 (<i>pro-S</i>), 2.11 (<i>pro-R</i>)	H_{γ} 1.93, H_{δ} 1.09
Phe 32	8.37	4.50	3.49	H_{δ} 7.40
Ile 33	8.81	3.78	2.26	H_{γ} 2.14, 1.54, H_{δ} 1.15
Asn 34	8.27	4.54	3.11 (<i>pro-R</i>), 2.84 (<i>pro-S</i>)	H_{δ} 7.41, 6.66
Phe 35	8.67	4.43	3.45	H_{δ} 7.36
Cys 36	8.26	4.00	3.31 (<i>pro-R</i>), 2.76 (<i>pro-S</i>)	
Leu 37	8.20	4.14	2.16	H_{γ} 1.85, H_{δ} 1.08, 1.00
Ile 38	8.11	3.86	2.17	H_{γ} 1.29, H_{δ} 1.03
Leu 39	7.91	4.11	1.87	H_{γ} 1.72, H_{δ} 0.95
Ile 40	8.26	3.79	2.20	$\text{H}_{\gamma 1}$ 1.97, $\text{H}_{\gamma 2}$ 1.32, H_{δ} 1.00
Phe 41	8.34	4.40	3.25	H_{δ} 7.39
Leu 42	8.60	4.12	2.15	H_{γ} 1.73, H_{δ} 1.07
Leu 43	8.44	4.05	2.07 (<i>pro-S</i>), 1.61 (<i>pro-R</i>)	H_{δ} 1.11
Leu 44	8.36	4.15	2.05	H_{γ} 1.86, H_{δ} 1.04
Ile 45	8.23	3.78	2.21	$\text{H}_{\gamma 1}$ 1.57, 1.23, $\text{H}_{\gamma 2}$ 1.07, H_{δ} 0.79
Cys 46	8.15	4.14	3.46 (<i>pro-R</i>), 2.94 (<i>pro-S</i>)	
Ile 47	8.25	3.78	2.16	$\text{H}_{\gamma 1}$ 2.33, 2.20, $\text{H}_{\gamma 2}$ 1.30, H_{δ} 1.24
Ile 48	8.47	3.84	2.08	$\text{H}_{\gamma 1}$ 2.01, $\text{H}_{\gamma 2}$ 1.30, H_{δ} 1.02
Val 49	8.32	3.85	2.38	H_{γ} 1.24, 1.14
Met 50	8.02	4.44	2.57 (<i>pro-S</i>), 2.32 (<i>pro-R</i>)	H_{γ} 2.96, 2.77
Leu 51	7.84	4.59	2.06 (<i>pro-R</i>), 1.77 (<i>pro-S</i>)	H_{δ} 1.06
Leu 52	8.02	4.53	2.08	H_{γ} 1.76, H_{δ} 1.04

Aus den $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten wurden über die Karplus-Beziehung [127] die für die Strukturrechnung verwendeten Dihedralwinkel für den Proteinrückgratwinkel ϕ berechnet (Tabelle 4.2)

Tabelle 4.2: $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten und Proteinrückgratwinkel ϕ aus der Feinstruktur des COSY-Kreuzsignals nach [126,127].

Aminosäure	$^3J_{\text{HNH}\alpha}$	ϕ
Asp 2	8.6 Hz	-143°
Thr 17	7.5 Hz	-154°
Ile 18	10.2 Hz	-120°
Leu 51	9.7 Hz	-119°
Leu 52	11.3 Hz	-120°

Die H_α -chemische Verschiebung der Aminosäuren Val4 bis Thr17 und Gln23 bis Val49 ist im Vergleich zum *random coil*-Wert zu höherem Feld verschoben. Dies weist auf eine α -helikale Struktur in diesem Bereich des Moleküls hin [128]. Für die Aminosäuren Ile18, Glu19, Met20 und Pro21 sowie die C-terminalen Reste Leu51 und Leu52 befinden sich die H_α -Resonanzen bei tieferem Feld im Vergleich zum *random coil*-Wert. Die N-terminalen Aminosäuren Met1, Asp2, Lys3 und Met50 zeigen nur geringe Abweichungen vom *random coil*-Wert. Bei einer Abweichung größer oder gleich 0.1 ppm vom *random coil*-Wert wird die entsprechende Aminosäure mit -1 oder +1 gewertet und in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz dargestellt (Abb. 4.6).

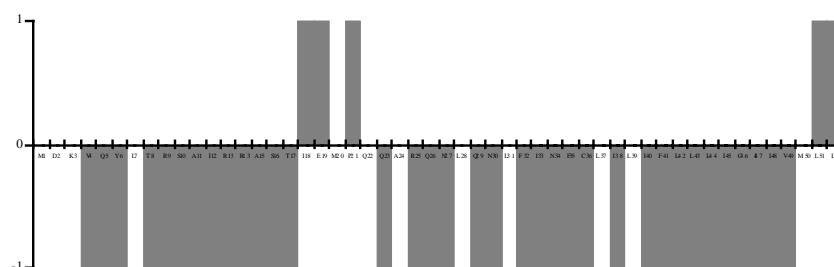


Abb. 4.6: Differenz der H_α -chemischen Verschiebung zu *random coil*-Werten nach Wishart [128], eine Abweichung von *random coil*-Wert ≥ 0.1 ppm wird auf eins normiert

Besitzen drei oder mehr aufeinander folgende Aminosäuren den gleichen Normierungswert, kann man an diesen Stellen eine α -Helix (-1) oder ein β -Faltblatt (+1) postulieren [128]. Eine Unterbrechung des Balkendiagramms durch eine Aminosäure kann toleriert werden. Im Falle Ile18, Glu19 und Pro21 ist der Abschnitt zu kurz, um von einem β -Faltblatt an dieser Stelle zu sprechen.

Im 800 MHz NOESY-Spektrum konnten insgesamt 644 NOEs für Phospholamban (C41F) zugeordnet werden. Diese teilen sich in 398 intraresiduale, 142 sequentielle und 104 mittelreichweitige NOEs auf. Ein Überblick über die gemessenen NOE-Kontakte ist in dem NOE-Balkendiagramm (Abb. 4.7) dargestellt. Die einzelnen strukturtypischen NOEs werden durch Balken symbolisiert, deren Stärke der Intensität des NOEs proportional ist.

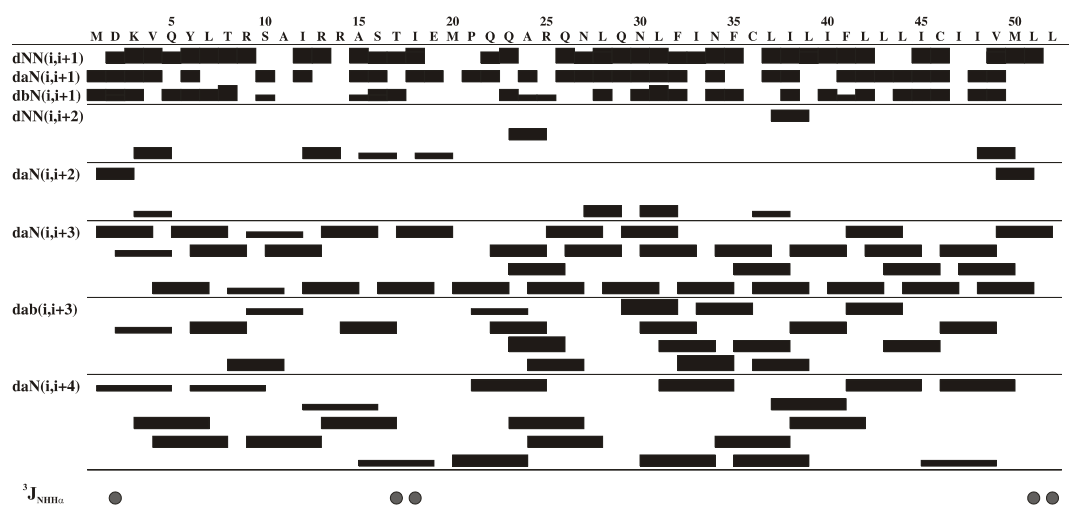


Abb. 4.7: Experimentelle NOE-Kontakte aus dem 800 MHz NOESY-Spektrum; hierbei bedeuten: $dNN(i,i+1) = \text{NOE } H^N H^N(i,i+1)$, $daN(i,i+1) = \text{NOE } H_\alpha H^N(i,i+1)$, $dbN(i,i+1) = \text{NOE } H_\beta H^N(i,i+1)$, $dNN(i,i+2) = \text{NOE } H^N H^N(i,i+2)$, $daN(i,i+2) = \text{NOE } H_\alpha H^N(i,i+2)$, $daN(i,i+3) = \text{NOE } H_\alpha H^N(i,i+3)$, $dab(i,i+3) = \text{NOE } H_\alpha H_\beta(i,i+3)$, $daN(i,i+4) = \text{NOE } H_\alpha H^N(i,i+4)$; die Stärke der Balken ist proportional zur Intensität der gemessenen NOE-Kreuzsignale, $^3J_{NH\alpha}$ werden durch gefüllte Kreise dargestellt.

Hierdurch ergeben sich im Mittel 12.4 NOE-Kontakte für jede Aminosäure (Abb. 4.8).

Es wurden keine *long range* NOEs ($i > i+4$) beobachtet.

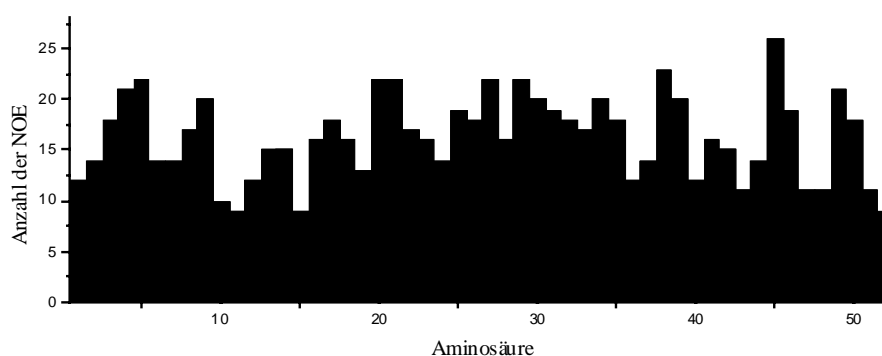


Abb. 4.8: NOE pro Aminosäure

Die Abstands-*restraints* wurden nach der Kalibrierung der geminalen H_{β} -Protonen von Cys36 auf 1.78 Å berechnet und in Abhängigkeit von der Intensität des Kreuzsignales in *strong* (≤ 2.8 Å), *medium* (2.9 – 4.0 Å) und *weak* (> 4.0 Å) eingeteilt. Für die Pseudoatome von Methyl- und Methylengruppen sowie die aromatischen Protonen wurde eine Korrektur von 0.5 Å pro Proton zu dem Abstands-*restraint* addiert [129].

4.2.3 Strukturrechnung

Für die Strukturrechnung wurden 398 intraresiduale NOE, 142 sequenzielle NOE und 104 mittelreichweitige NOE mit dem Programm X-PLOR [56], Version 98.1, herangezogen. Das *simulated annealing*-Protokoll ist in Abb. 4.9 gezeigt.

Das *simulated annealing*-Protokoll beginnt mit einer ersten Energieminimierung mit 50 Optimierungsschritten nach der Methode der konjugierten Gradienten. Anschließend wird eine Hoch-Temperaturphase (2000 K, 32.5 ps, 6500 Schritte, $k_{\text{NOE}} = 0 - 50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$) simuliert, bei der bereits alle Abstandsinformationen wirksam sind. Nach der ersten Kühlphase (2000 – 1000 K, 25 ps, 5000 Schritte), in der die Dihedralwinkel in die Rechnung eingeschaltet werden, und der zweiten Kühlphase (1000 – 100 K, 10 ps, 2000 Schritte) beginnt die endgültige Energieminimierung mit insgesamt 200 Optimierungsschritten mit konjugierten Gradienten.

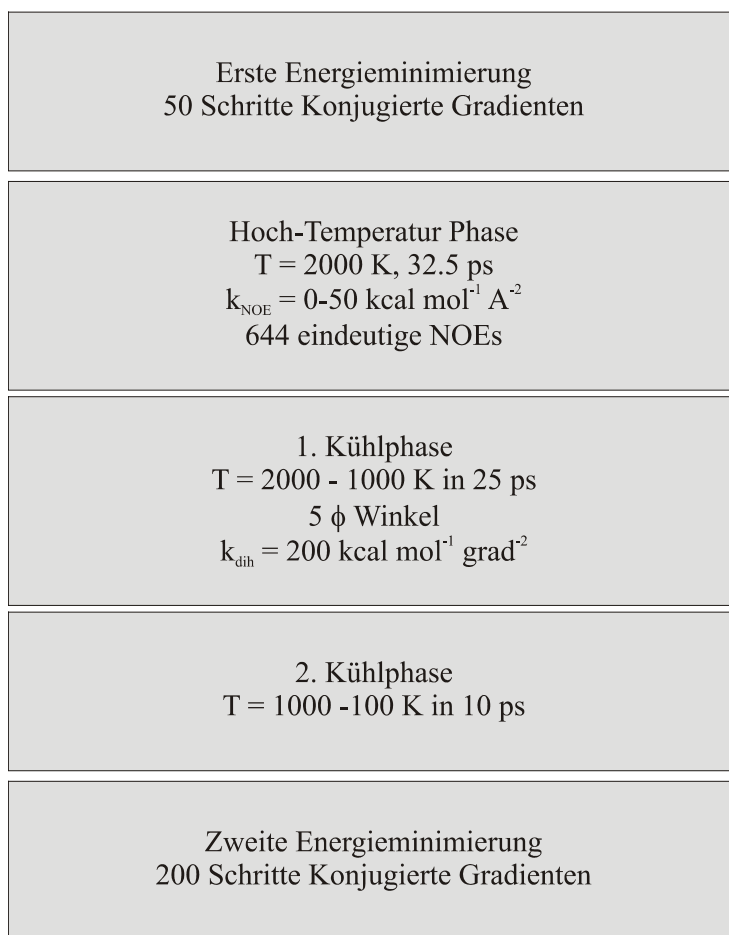


Abb. 4.9: Ablauf des *simulated annealing*-Protokolls

Bei den nicht stereospezifisch zugeordneten Protonen der Methylengruppen und den diastereotopen Methylgruppen von Valin und Leucin wurde die *floating chirality*-Prozedur von X-PLOR angewendet. Hierbei werden die Protonen bzw. Methylgruppen in den prochiralen Zentren ausgetauscht und dann überprüft, ob die Abstandsinformationen so besser erfüllt werden können.

4.2.4 Die Struktur von Phospholamban

Für die Erzeugung der Strukturen wurden 644 Abstands-*restraints* und fünf Dihedral-*restraints* für den Winkel ϕ eingesetzt. Insgesamt wurden 100 Strukturen mit dem *simulated annealing*-Protokoll gerechnet, von denen die zehn energetisch niedrigsten Strukturen weiter analysiert wurden. Die Struktur des Phospholambans (C41F) besteht

aus zwei α -helikalen Bereichen, die über einen β -turn (Typ III) bestehend aus vier Aminosäuren vor Pro21 verbunden sind.

Die zehn berechneten Strukturen stehen im Einklang mit den experimentellen Daten. Es treten keine Verletzungen der $\text{NOE} > 0.30 \text{ \AA}$ auf und die Dihedralwinkel sind im Bereich $\pm 5^\circ$ nicht verletzt. Die Energien der Strukturen liegen im normalen Bereich für die Molekülgröße (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Gesamtenergie und Einzelbeiträge in kcal/mol für die zehn energetisch günstigsten Strukturen

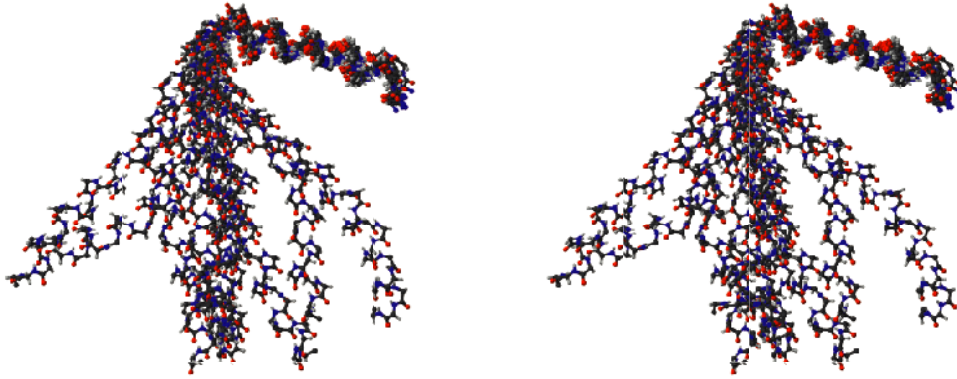
Energie	Mittelwert (kcal/mol)
E_{tot}	200.2 ± 4.1
E_{bond}	11.6 ± 0.8
E_{angle}	69.8 ± 2.2
E_{impr}	7.5 ± 0.5
E_{vdw}	11.1 ± 1.3
E_{noe}	73.4 ± 5.3
E_{cdih}	0.25 ± 0.48

Der *rmsd*-Wert (*root mean square deviation*) ist ein Maß für die Qualität der berechneten Strukturen und beschreibt die Standardabweichung der Strukturen untereinander. Weil die beiden α -helikalen Bereiche, die über einen kurzen flexiblen β -turn (Typ III) verbunden sind, nicht relativ zueinander orientiert sind, wurde der *rmsd*-Wert für beide Abschnitte separat mit dem Programm MOLMOL [130] berechnet. Für die N-terminale Helix von Phospholamban (C41F) ergibt sich für das Proteinrückgrat ein *rmsd*-Wert von 0.58 \AA (Aminosäuren 4-16) und für die C-terminale Helix ein *rmsd*-Wert von 0.92 \AA (Aminosäuren 21-49).

Bei der Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Strukturen des Proteinrückgrates (Abb. 4.10) kann man erkennen, daß die beiden α -helikalen Bereiche gut definiert sind, während der Bereich zwischen den beiden Helices noch eine gewisse

Flexibilität aufweist. Der Winkel zwischen den beiden Helices beträgt $68 \pm 23^\circ$, welches im guten Einklang mit dem Ergebnis von Pollesello *et al.* [116] steht.

a)



b)

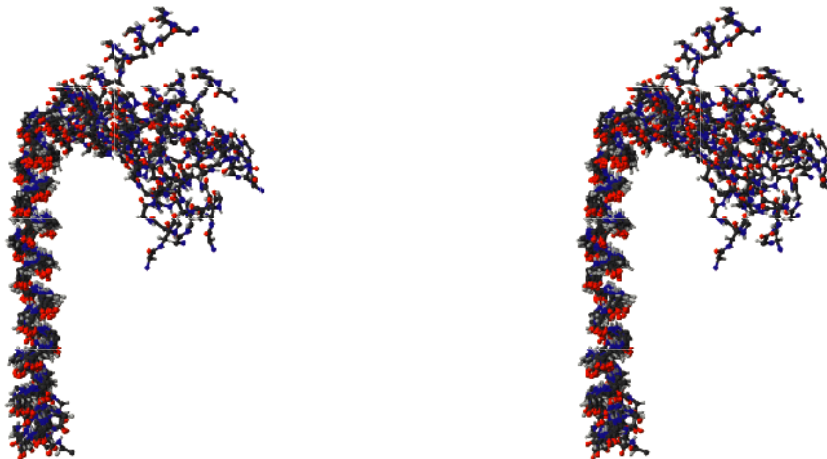


Abb. 4.10: Überlagerung des Proteinrückgrats a) der N-terminalen Helix (Aminosäuren 4-16) und b) der C-terminalen Helix (Aminosäuren 21-49) der zehn energetisch günstigsten Strukturen

Im Ramachandran-Plot, der eine Korrelation zwischen dem Proteinrückgratwinkel ϕ und ψ darstellt, erkennt man, daß 87.8 % der Werte im bevorzugten Bereich liegen und sich keiner der Proteinrückgratwinkel außerhalb des erlaubten Bereichs befindet (Abb. 4.11).

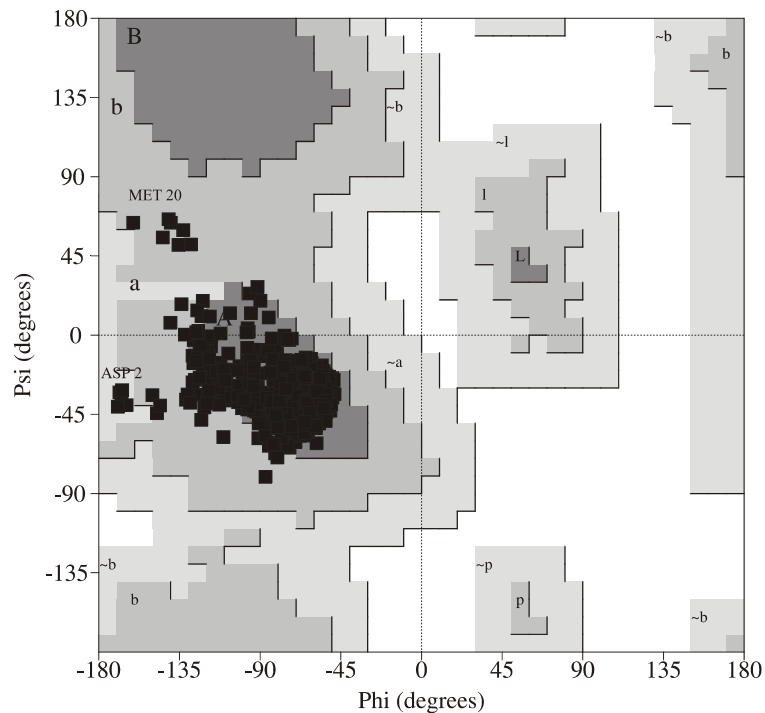


Abb. 4.11: Ramachandran-Plot der zehn energetisch günstigsten Strukturen. Gefärbte Bereich markieren konformationell bevorzugte Bereich für α -Helices (A, a, $\sim a$), antiparalleles β -Faltblatt (B, b, $\sim b$), paralleles β -Faltblatt (P, p, $\sim p$) und linksgängige α_L -Helices (L, l, $\sim l$). Großbuchstaben bezeichnen die bevorzugten Regionen, Kleinbuchstaben die zusätzlich erlaubten Bereiche und die Tilde markiert großzügig erlaubte Bereiche

Fast alle ϕ - und ψ -Proteinrückgratwinkel der zehn energetisch günstigsten Strukturen des Phospholambans (C41F) nehmen α -helikale Werte ein. Die Ausnahmen bilden der N-terminale Rest Asp2 und Met20, welches sich am Anfang des zweiten helikalen Bereiches befindet.

Die Grafiken und folgenden Statistiken wurden mit den Programmen AQUA und PROCHECK-NMR von Laskowski *et al.* [131] durchgeführt, welche durch NMR-Daten erzeugte Strukturen auf ihre Konsistenz prüfen. Eine Zusammenfassung des Ramachandran-Plots gibt Tabelle 4.4 wieder.

Tabelle 4.4: Statistik zum Ramachandran-Plot: A, a, = α -Helix, B, b = antiparalleles β -Faltblatt, L, l = α_L -Helix, p = paralleles Faltblatt

Reste im bevorzugten Bereich (A, B L)	430	87.8 %
Reste im zusätzlich erlaubten Bereich (a, b, l, p)	55	11.2 %
Reste im großzügig erlaubten Bereich (~a, ~b, ~l, ~p)	5	1.0 %
Reste im verbotenen Bereich	0	0.0 %

Durch eine Auflistung des Ramachandran-Plots jeder einzelnen Aminosäure (Abb. 4.12) kann man erkennen, daß die Proteinrückgratwinkel in den α -helikalen Bereichen gut definiert sind.

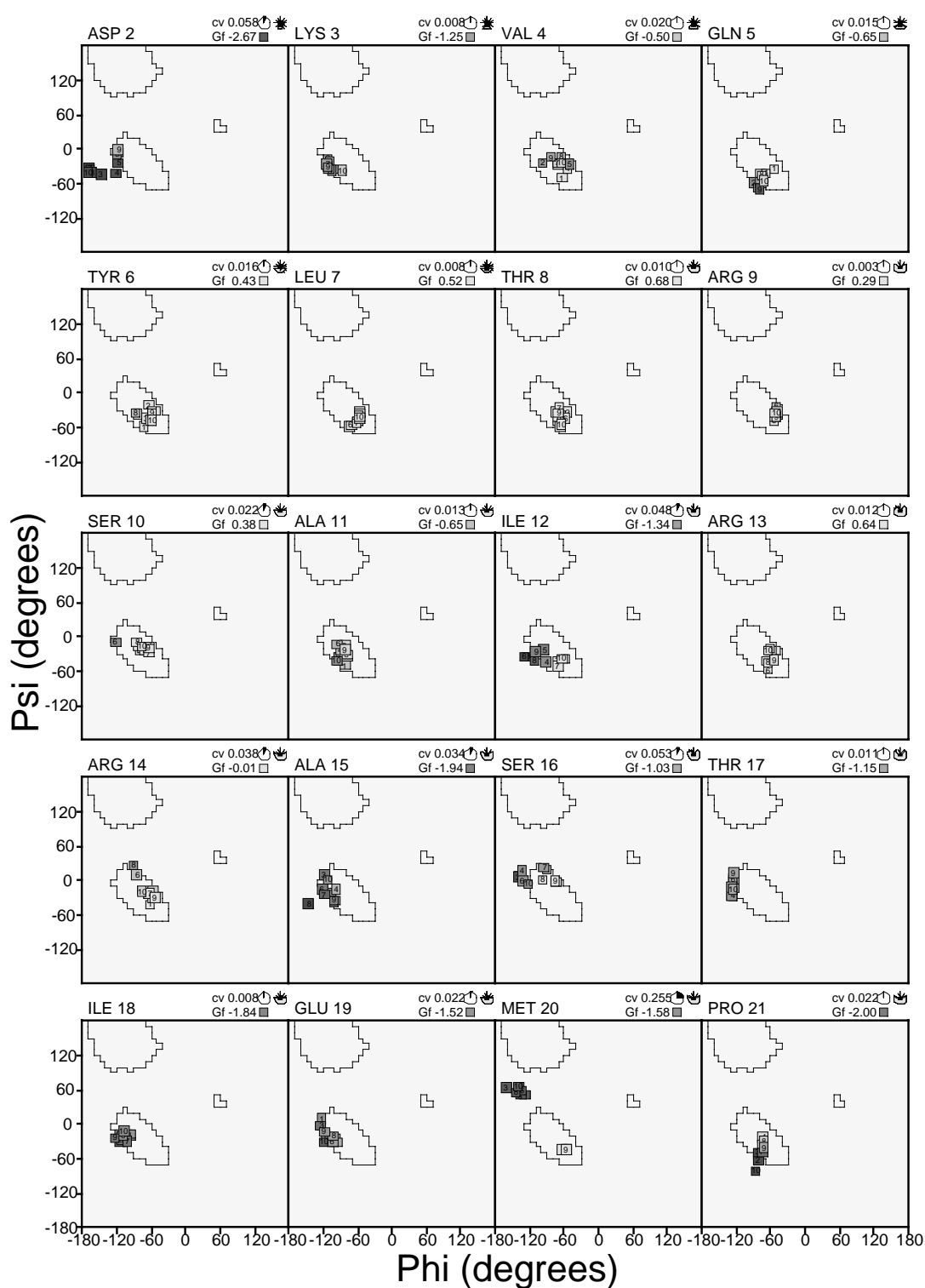


Abb. 4.12: Ramachandran-Plots nach einzelnen Aminosäuren aufgeschlüsselt. Die am meisten bevorzugten Regionen des Ramachandran-Plots sind durch eine graue Linie markiert, wobei auch Regionen außerhalb dieser Bereiche noch als erlaubte Regionen gelten. Hellgraue Kästchen symbolisieren bevorzugte Konformationen, dunkelgraue weniger bevorzugte.

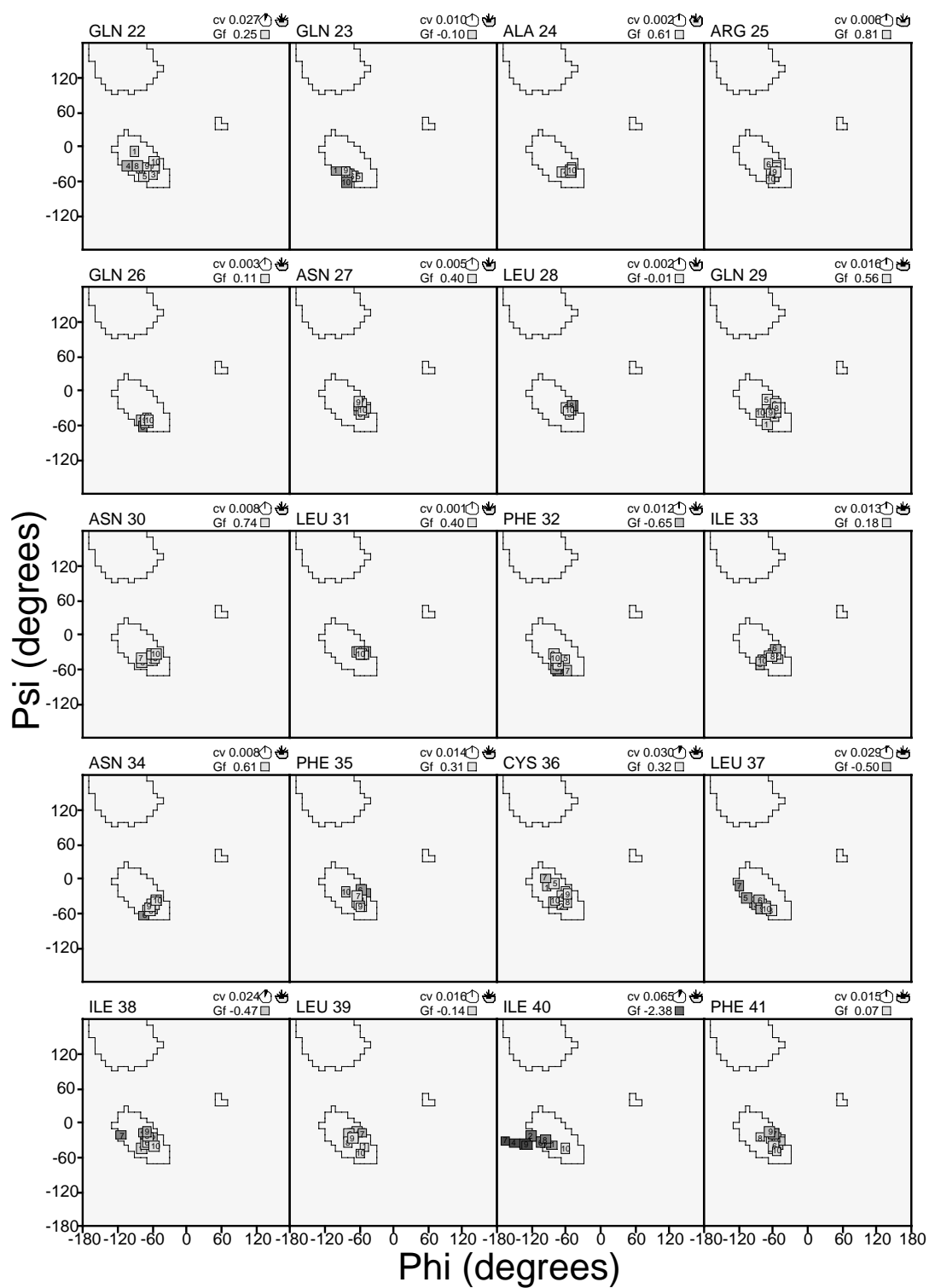


Abb. 4.12 (Forts.)

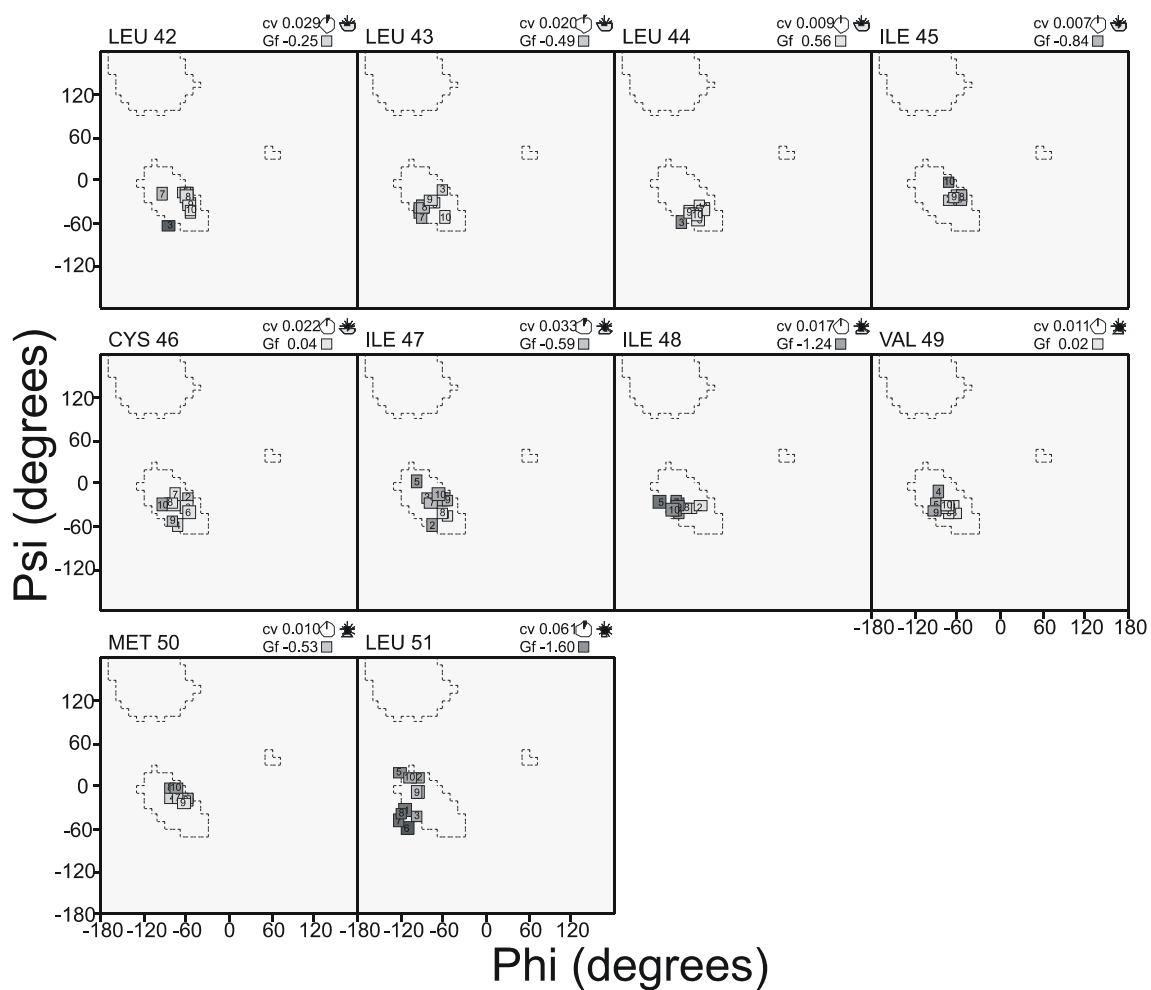


Abb. 4.12 (Forts.)

In Abb. 4.13 ist die Verteilung des Seitenkettenwinkels χ_1 der zehn energetisch günstigsten Strukturen von Phospholamban (C41F) gezeigt. Auch hier befinden sich alle Winkel im erlaubten Bereich.

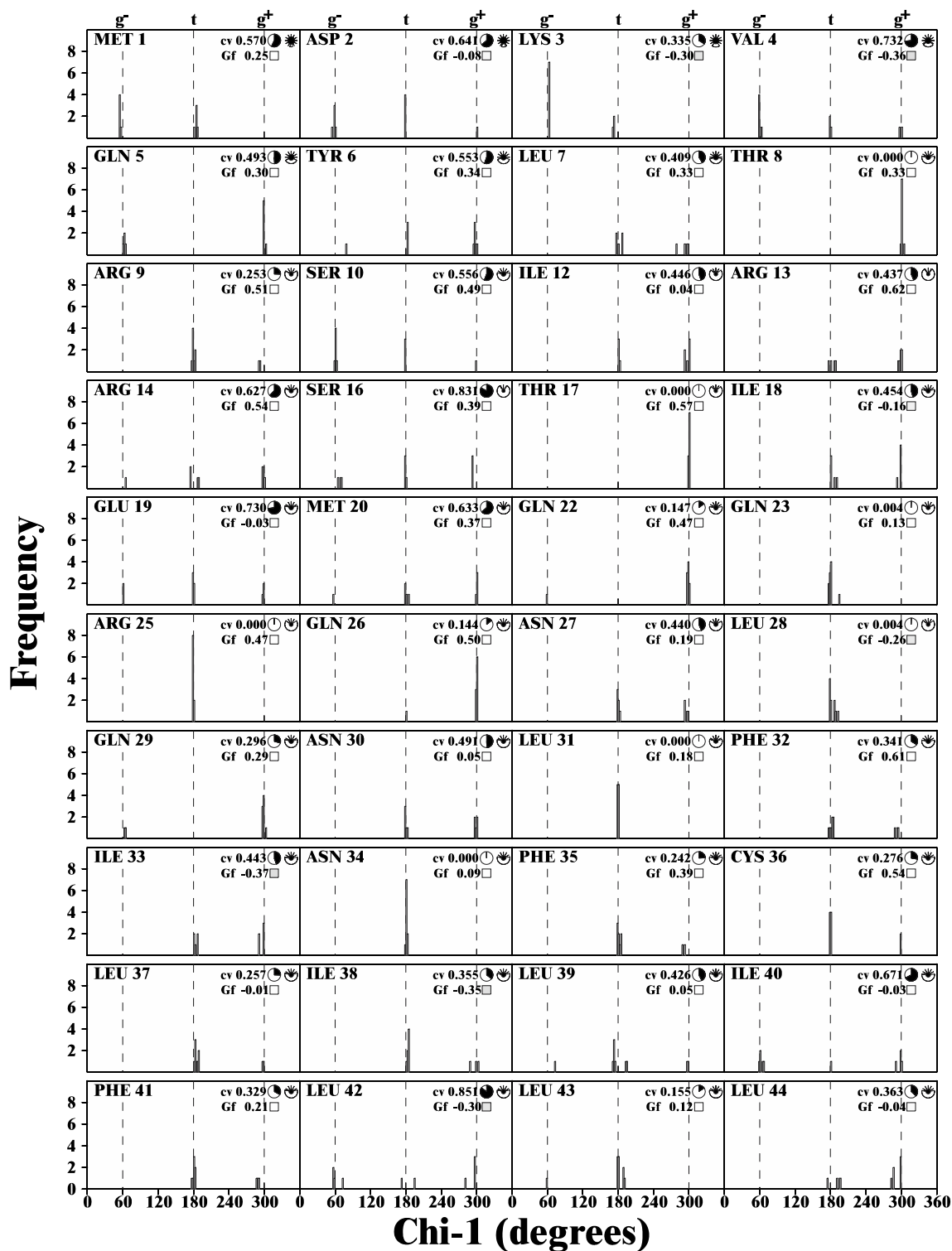


Abb. 4.13: Verteilung des Seitenkettenwinkels χ_1 der zehn energetisch günstigsten Strukturen.

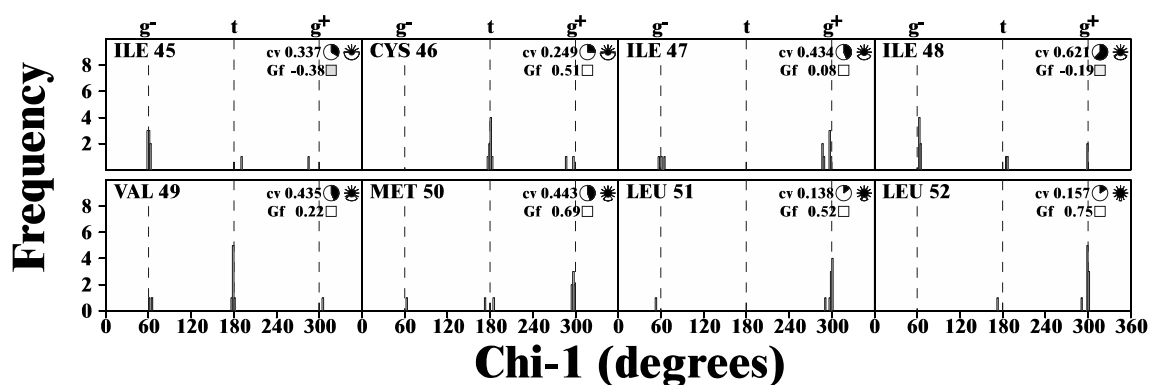


Abb. 4.13 (Forts.)

Eine Analyse der Proteinrückgratwinkel ϕ und ψ sowie des Seitenkettenwinkels χ_1 ist in Abb. 4.14 und Abb. 4.15 in Form von zirkularen Varianzen gezeigt. Der Wert des jeweiligen Winkels in den einzelnen Strukturen ist in einem Kreis eingetragen. Wenn die Werte in den einzelnen Strukturen identisch sind, ergibt sich eine Gerade. Die Winkel, für die ein Dihedralwinkel-*restraint* in der Strukturrechnung verwendet wurde, sind grau unterlegt.

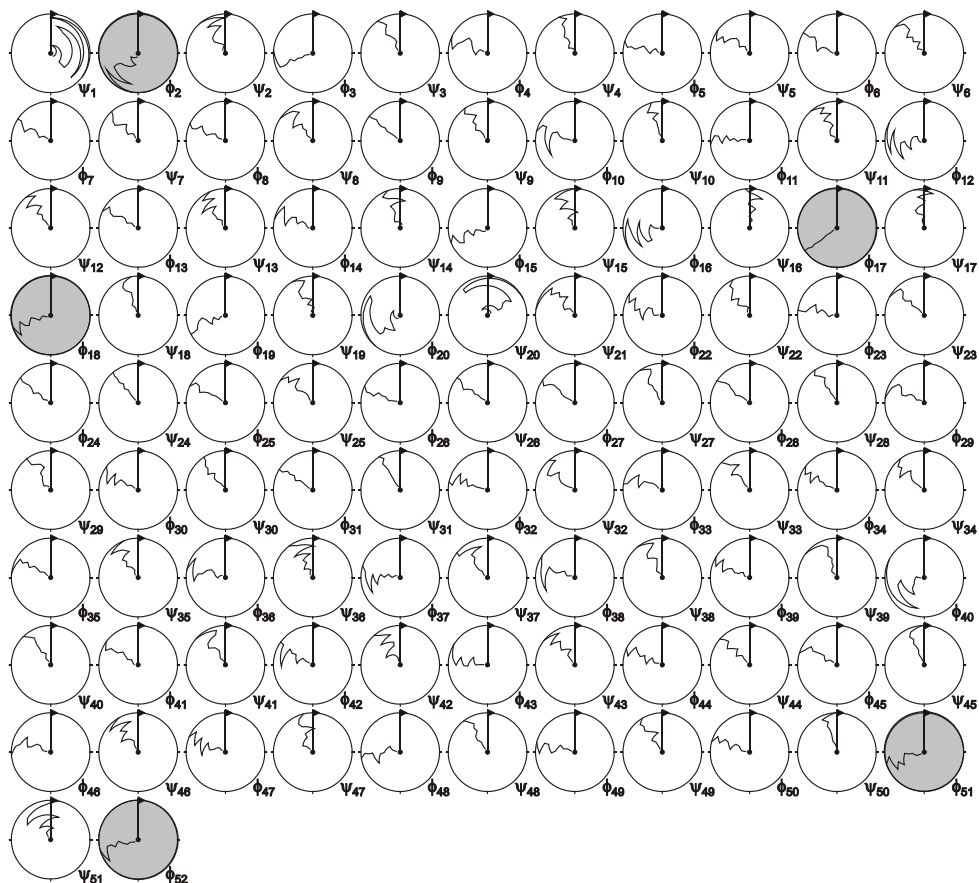


Abb. 4.14: Zirkulare Varianzen für die Rückgratwinkel ϕ und ψ . Winkel, für die ein restraint verwendet wurde, sind grau unterlegt. Die Toleranzen für den restraint betrugen $\pm 25^\circ$

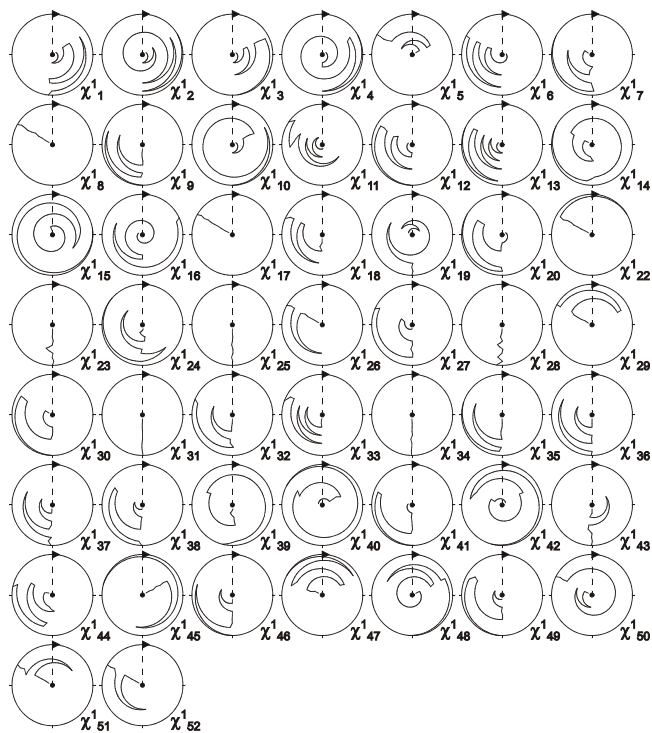


Abb. 4.15: Zirkulare Varianzen für den Seitenkettenwinkel χ_1 .

Abb. 4.16 gibt die NMR-Struktur des Phospholambans (C41F) in der *ribbon*-Darstellung wieder, die mit der anhand der experimentellen Daten (Abb. 4.6, Abb. 4.7) durchgeführten qualitativen Analyse der Sekundärstrukturelemente übereinstimmt. Phospholamban besteht aus zwei α -helikalen Regionen (Val4-Ser16 und Pro21-Val49), die über einen β -turn (Typ III) verbunden sind. Der β -turn (Typ III) wurde zum einen anhand der $C_{\alpha}(i)$ - $C_{\alpha}(i+3)$ -Abstände, welche in einem Bereich von 5.6 Å liegen, und zum anderen durch die Torsionswinkel $\phi(i+1) = -120^\circ$ und $\psi(i+1) = -30^\circ$ für Ile18 und $\phi(i+2) = -30^\circ$ und $\psi(i+2) = -120^\circ$ für Glu19 definiert [132]. Zwischen O' von Thr17 und H^N von Met20 konnte keine Wasserstoff-Brücke beobachtet werden.

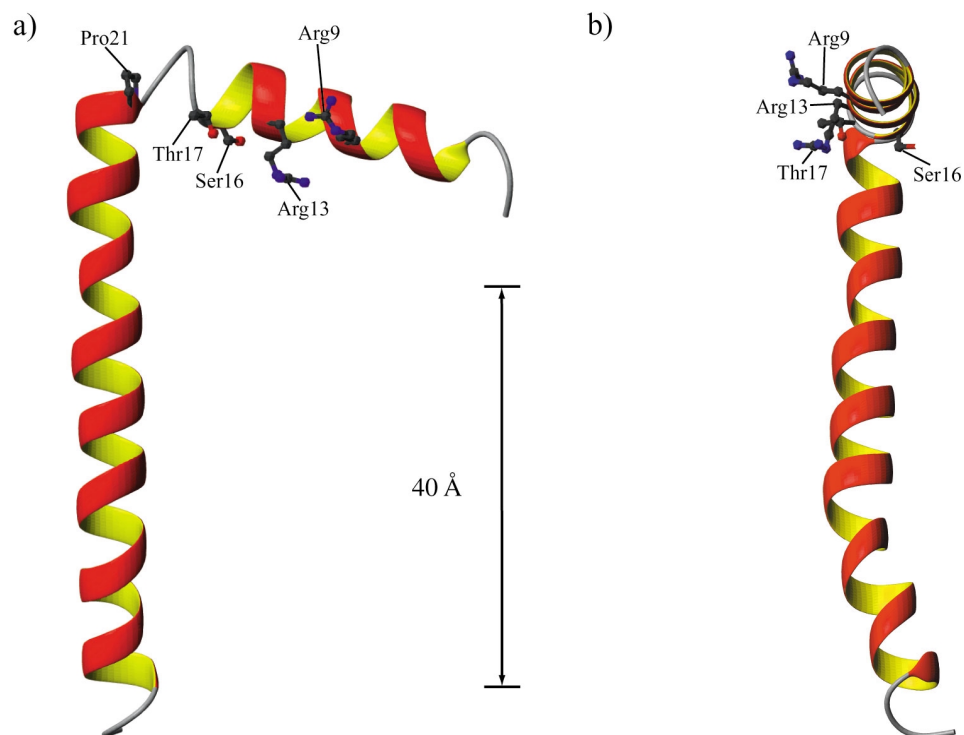


Abb. 4.16: *Ribbon-Darstellung der Struktur von Phospholamban (C41F). Die Seitenketten von Arg9, Arg13, Ser16, Thr17 und Pro21 sind dargestellt. In b) ist die Orientierung der Seitenkette von Arg9, Arg13, Ser16 und Thr17 zu der C-terminalen Helix gezeigt, welche einen Winkel von ca. 60° einnimmt. Der Pfeil deutet den transmembranen Teil der Struktur an, dessen Länge von 40 Å der Dicke einer biologischen Membran entspricht.*

Die beiden *in vivo*-Phosphorylierungsstellen Ser16 und Thr17 befinden sich im Winkel zwischen den beiden Helices und zeigen in Richtung der C-terminalen Helix. Nach der Phosphorylierung könnte sich durch die Einführung der geladenen Phosphat-Gruppe die N-terminale Helix von der Membranoberfläche abstoßen und sich so die relative Orientierung der beiden Helices zueinander ändern. Für die Wechselwirkung mit der Ca^{2+} -ATPase sind positiv geladene Aminosäuren, insbesondere Arg9 und Arg13, im N-Terminus des Phospholambans verantwortlich [133]. In der vorliegenden Struktur befinden sich Arg9 und Arg13 auf der selben Seite der N-terminalen Helix und ihre Seitenketten nehmen zu der C-terminalen Helix einen Winkel von ca. 60° ein. Hierdurch wird eine direkte Wechselwirkung von Arg9 und Arg13 des Phospholambans mit der Ca^{2+} -ATPase ermöglicht. Bei der Bindung von Phospholamban an die Ca^{2+} -ATPase kann sich die relative Orientierung der beiden helikalen Bereiche im Phospholamban ändern, welches durch die hohe Flexibilität der *turn*-Region im Phospholamban zwischen den beiden α -Helices gewährleistet sein sollte.

Die Koordinaten der zehn energetisch günstigsten Strukturen von Phospholamban (C41F) wurden in der *Brookhaven Protein Data Bank* unter der PDB ID 1FJP und die Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebungen von Phospholamban (C41F) in der *BioMagRes*-Datenbank unter der Nr. 4907 eingereicht.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden konformationelle und strukturelle Eigenschaften von Biomolekülen mit Hilfe von NMR-spektroskopischen und biochemischen Methoden, sowie der Synthese von Liganden untersucht.

In Kapitel 2 wurde das Verhalten der beiden Hauptkonformere des Dolastatin 10 in Gegenwart von Tubulin untersucht. Es wurden sechs neuartige Dolastatin 10-Derivate synthetisiert, welche die Tubulin-Polymerisation sehr unterschiedlich inhibieren. Das Protein Tubulin wurde sowohl für die *in vitro*-Bindungsstudien als auch für die NMR-spektroskopischen Experimente isoliert. Die Verbindungen **35a** und **35b** repräsentieren jeweils das cis- und das trans-Konformer des Dolastatin 10, wobei erstere einen stärkeren inhibitorischen Effekt bei der Tubulin-Polymerisation als das lineare Dolastatin 10-Derivat **41** zeigte. Daraus kann man schließen, daß die cis-Konformation des Dolastatin 10 für die Inhibition der Tubulin-Polymerisation verantwortlich ist. Durch diese neue Erkenntnis können Dolastatin 10-Derivate, welche dem cis-Konformer des Dolastatin 10 entsprechen, synthetisiert werden und als potentielle Krebstherapeutika ihre Anwendung finden.

In einem zweiten Ansatz wurde das ^{15}N -markierte lineare Dolastatin 10-Derivat **49** mit heteronuclearen zweidimensionalen NMR-Experimenten in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin untersucht. Durch die Bestimmung der Korrelationszeiten für das cis-Konformer der Verbindung in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin aus den in beiden Dimensionen gekoppelten ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren konnte gezeigt werden, daß sich das cis-Konformer von **49** im schnellen Austausch mit der gebundenen Form befindet. In Gegenwart von DEAE-Tubulin stellt man einen erhöhten cis-Gehalt von **49** fest, welcher auf eine schwache Bindung des Liganden hindeutet. Im Falle des MAP-

Tubulins ist der Anteil des cis-Konformers von **49** im Vergleich zu der freien Verbindung nahezu unverändert. Durch die erhöhte Korrelationszeit des cis-Konformers von **49** in Gegenwart von MAP-Tubulin kann man eine zusätzliche Wechselwirkung mit den MAPs annehmen, welche eventuell die Bindung von **49** an die β -Untereinheit des Tubulins verstärkt. Außerdem könnte die Wechselwirkung der MAPs mit dem Tubulin durch den Liganden gestört werden.

Bei den entsprechenden Messungen mit ^{13}C -markiertem Colchicin in Gegenwart von DEAE- und MAP-Tubulin konnte ebenfalls ein schneller Austausch des Liganden mit der gebundenen Form nachgewiesen werden. Hierbei wurde aber kein unterschiedliches Verhalten bei den beiden Tubulin-Sorten festgestellt. Die Bindungsstelle des Colchicin an der β -Untereinheit des Tubulins unterscheidet sich von der des Dolasatin 10 (Abb. 2.12). Deshalb kann man hier zusätzliche Wechselwirkungen mit den MAPs ausschließen.

Die Versuche zum Einsatz von Vanadat als Übergangszustandanalogen für Phosphat bei der Spaltreaktion des Hammerhead Ribozyms wurden in Kapitel 3 beschrieben. Zunächst wurden die experimentellen Rahmenbedingungen für die Komplexbildung von Vanadat mit 1,2-cis-Diolen der Ribose an einfachen Nucleosiden und Nucleotiden getestet. Hier konnte gezeigt werden, daß freie Phosphatgruppen die Komplexbildung des Vanadats an dem 1,2-cis-Diol der Ribose verhindern. Allerdings stört die Anwesenheit von Phosphorsäureestern nicht die gewünschte Komplexbildung. Diese Erkenntnisse wurden bei den verschiedenen RNA-Konstrukten des Hammerhead Ribozyms berücksichtigt. Durch die Einführung von desoxy-Ribose in den 3'-terminalen Nucleosiden konnte die Komplexbildung mit Vanadat in den Fällen beobachtet werden, in denen sie zu erwarten war, wenn sich das Vanadat anstelle des Phosphates nach dem A17 im Hammerhead Ribozym befindet. So konnte gezeigt werden, daß Vanadat als Über-

gangszustandsanalogon für Phosphat bei der Spaltung des Hammerhead Ribozyms eingesetzt werden könnte.

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Membranproteins Phospholamban in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ wurde in Kapitel 4 beschrieben. Hierbei wurden die aus homonuclearen zweidimensionalen Spektren gewonnenen Abstandsinformationen aus NOE-Daten und Dihedralwinkel aus Kopplungskonstanten verwendet, um die Struktur des Phospholambans in Lösung zu gewinnen. Phospholamban besteht aus zwei α -helikalen Regionen (Val4-Ser16 und Pro21-Val49), die über einen β -turn (Typ III) verbunden sind. Die *turn*-Region weist eine hohe Flexibilität auf, welche wichtig für seine biologische Wirkung sein könnte. So könnte hier die Annäherung von Enzymen z.B. den Proteinkinasen oder der Ca^{2+} -ATPase erleichtert werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Synthese von Dolastatin 10-Derivaten und ^{13}C -markiertem Colchicin

6.1.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Alle **Chemikalien** entsprachen der Qualität p.a. und wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Merck-Schuchardt und Propeptide bezogen.

Z-geschützte Aminosäuren wurden von der Firma BASF/Ludwigshafen zur Verfügung gestellt.

Alle **Lösungsmittel** wurden vor Gebrauch destilliert bzw. nach gängigen Vorschriften absolutiert.

Als **Schutzgas** bei feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurde Argon der Qualität 4.8 verwendet.

Die **analytische Dünnschichtchromatographie** wurde auf Fertigfolien mit Fluoreszenzindikator Polygram Sil G/UV 254 der Firma Machery, Nagel & Co./Dueren, Schichtdicke 0.25 mm durchgeführt.

Die Detektion erfolgte durch Eintauchen in 1%-ige Kaliumpermanganat-Lösung und nachfolgender Wärmebehandlung mit einem Heißluftgebläse.

Die **präparativen säulenchromatographischen Aufreinigungen** wurden bei einem Überdruck von 1.5 bis 4.0 bar mit Kieselgel 60 (15 – 40 μm , Merck, Darmstadt) durchgeführt.

Es wurde die 30- bis 60-fache Menge Kieselgel bezogen auf das zu trennende Substanzgemisch eingesetzt.

Analytische und präparative HPLC-Untersuchungen wurden auf Anlagen der Firma Merck-Hitachi L-6200 mit Dioden-Array-Detektor L-3000 und Autosampler AS-4000, der Firma Bruker 3 Kolbenpumpe mit Gynkotek 160/2 UV-Detektor und Bruker HPLC-Pumpe LC21, sowie der Firma Jasco mit Multiwavelength Detektor MD-910 und Advantec SF-2120 Super Fraction Collector bei einer Flußrate von 1ml/min. durchgeführt.

Folgende Säulen wurden für die analytische und die präparative HPLC verwendet:

Säule A: Eurospher RP18 100A 4 x 250 mm 5 µm

Säule B: Eurospher C-18 4 x 250 mm 100 Å

Säule C: Kromasil RP18 4,6 x 250 mm 5µm

Gradient 1: 0 - 100% Acetonitril + 0.1% TFA 50 Minuten

Die **Gefriertrocknung** von HPLC-gereinigten Verbindungen erfolgte an einer Anlage Alpha 2-4 der Firma Christ mit einer Vacuubrand RC 4 Pumpe bzw. einer Vacuubrand RC 5 Pumpe.

Die **Schmelzpunkte** wurden mit einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur nach Dr. Tottoli der Firma Gallenkamp bestimmt und sind nicht korrigiert.

Die **ESI-Massenspektren** wurden mit einem Gerät VG Platform II der Firma Fison aufgenommen.

Die **NMR-Spektren** wurden an den Spektrometern WH250, AM270, AMX400, AMX600 und DRX600 der Firma Bruker/Karlsruhe aufgenommen.

Die chemischen Verschiebungen beziehen sich im ^1H -Spektrum auf Tetramethylsilan als internem Standard und im ^{13}C -Spektrum auf die Resonanz des deuterierten Lösungsmittels. Meßfrequenz, Lösungsmittel und Temperatur wurden den Daten

vorangestellt. Im Falle der geschützten Peptide wurden zweidimensionale Experimente wie DQF-COSY, TOCSY, HSQC und HMBC für die genauere Untersuchung der Verbindung herangezogen.

Die Multiplizität der Signale wird mit s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Duplett), ddd (Duplett von Duplett von Duplett), t (Triplett), q (Quadruplett), p (Pentett) und M (Multiplett) angegeben.

In den Peaklisten wurde die im Formelschema aufgeführte Numerierung der Atome verwendet, die nicht unbedingt mit der IUPAC-Numerierung in Einklang steht.

6.1.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

6.1.2.1 Abspalten der Z-Schutzgruppe (AAV 1) [134]

Die zu entschützende Verbindung wurde in 10 ml/mmol Methanol gelöst und durch Einleiten von Argon von Sauerstoff befreit. Danach wurden 5 mol% Palladium auf Aktivkohle (10 %ig) zugegeben. Es wurde ein H₂-Gasstrom bis zur vollständigen Entschützung durchgeleitet. Nach dem Abfiltrieren wurde der Katalysator mehrmals mit Methanol gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt.

6.1.2.2 Abspalten der Boc. bzw. *tert.*-Butylschutzgruppe (AAV 2)

In einem Kolbern wurde die zu entschützende Substanz in CH₂Cl₂ (2 ml/mmol) gelöst und bei Raumtemperatur mit 10 bis 50 % TFA versetzt. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Zum Entfernen der TFA-Reste wurde dreimal mit Toluol coevaporiert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

6.1.2.3 Verseifung von Methylestern (AAV 3)

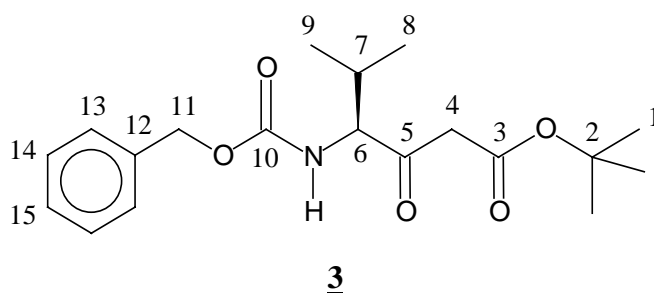
Der Ester wurde in Dioxan (10 ml/mmol) gelöst und mit 1 ml 2 M Natronlauge versetzt. Nach 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Dioxan im Vakuum entfernt. Die zurückbleibende Lösung wurde mit 2 M Salzsäure auf pH 3 eingestellt und dreimal mit Essigester (5 ml/mmol) extrahiert. Nach dem Trocknen über MgSO_4 wurde abfiltriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

6.1.2.4 Peptidkupplungen mit n-Propylphosphonsäureanhydrid (AAV 4)

1.1 mmol N-geschützte Aminosäure wurde mit 1 mmol freiem Amin in 5 ml CH_2Cl_2 gelöst und auf 0 °C gekühlt. Danach wurden 5 mmol PPA-Lösung (50%ig in Essigester) und 10 mmol DIEA zugetropft. Nach drei Stunden ließ man auf Raumtemperatur erwärmen und läßt noch ein bis zwei Tage rühren. Die Lösung wurde mit 10 ml 10%iger Citronensäure und mit 10 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

6.1.3 Synthese der zyklischen Dolastatin 10-Derivate

6.1.3.1 tert.-Butyl-(4S)-4-[N-(benzyloxycarbonyl)-amino]-5-methyl-3-oxohexanoat 3



Zu einer auf –78 °C gekühlten Lösung von 132 mmol Lithium-Enolat, hergestellt aus 19.6 ml (137 mmol) Diisopropylamin, 70.1 g (132 mmol) n-BuLi und 19.9 ml (147 mmol) Essigsäure-tert.-butylester in 400 ml THF, wurde unter Argon langsam eine Lösung des Aminosäureimidazolid 2, hergestellt aus 7.35 g (29.3 mmol)

N-(Benzyloxycarbonyl)-*S*-Valin und 5.28 g (32.6 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol in 90 ml THF, mittels Transferkanüle zugetropft. Unter Erwärmen der Lösung auf 0 °C wurde 3 Stunden nachgerührt und der Ansatz bei –78 °C mit 300 ml ges. NH₄Cl-Lösung und 300 ml 2 M Salzsäure versetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde dreimal mit je 300 ml Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit je 75 ml 2 M Salzsäure und ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie über 300 g Kieselgel (H/EE 4:1) erhielt man ein dickflüssiges, leicht bräunliches Öl.

Ausbeute: 9.9 g (89 % der Theorie)

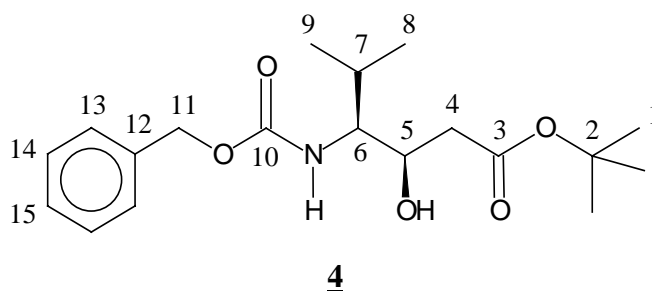
R_f = 0.89 (T/EE 1:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 7.36 - 7.26 (m, 5, ar.), 5.46, 5.42 (br. d, 1, NH, ³J = 8.8 Hz), 5.11 (ψ-s, 2, bzl.), 4.49, 4.47, 4.45, 4.43 (dd, 1, H-6, ³J = 8.8 Hz, ³J = 3.9 Hz), 3.44 (s, 2, H-4, H-4'), 2.31 - 2.24 (m, 1, H-7), 1.48 - 1.45 (ψ-s, 9, H-1), 1.04, 1.02 (d, 3, H-8, H-9, ³J = 6.8 Hz), 0.81, 0.78 (d, 3, H-8, H-9, ³J = 6.8 Hz)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 201.89 (C-5), 165.65, 156.36 (C-3, C-10), 136.13 (C-12), 128.46, 128.13, 128.01 (C-13, C-14, C-15), 82.26 (C-2), 67.00 (C-11), 64.62 (C-6), 48.24 (C-4), 29.56 (C-7), 27.82 (C-1), 19.75, 16.39 (C-8, C-9)

MS: C₁₉H₂₇NO₅ ber. 349.49 gef. (M+H)⁺ = 350 ESI+

6.1.3.2 tert.-Butyl-(3*R*,4*S*)-4-[N-(benzyloxycarbonyl)-amino]-5-methyl-3-hydroxyhexanoat **4**



Zu einer Lösung aus 3.5 g (10.0 mmol) **3** in 40 ml Methanol wurden bei 0 °C 2.3 g (60 mmol) NaBH₄ gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der zurückbleibende weiße Niederschlag wurde in 300 ml Wasser/Essigester aufgenommen und dreimal mit je 50 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 200 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie über 200 g Kieselgel (H/EE 4:1) erhielt man einen wachsartigen, weißen Feststoff.

Ausbeute: 2.8 g (80% der Theorie)

R_f = 0.18 (H/EE 4:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 7.37 - 7.24 (m, 5, ar.), 5.08 (s, 2, bz.), 4.99, 4.95 (br. d, 1, NH, ³J = 10.3 Hz), 3.94 - 3.88 (m, 1, H-5), 3.62 - 3.53 (m, 2, H-6, OH), 2.54, 2.53, 2.48, 2.46 (dd, 1, H-4, ³J = 3.3 Hz, ²J = 16.5 Hz), 2.42, 2.39, 2.36, 2.32 (dd, 1, H-4', ³J = 8.8 Hz, ²J = 16.3 Hz), 2.20 - 2.08 (m, 1, H-7), 1.44 (s, 9, H-1), 0.94, 0.91 (d, 3, H-8/H-9, ³J = 6.9 Hz), 0.87, 0.84 (d, 3, H-8/H-9, ³J = 6.8 Hz)

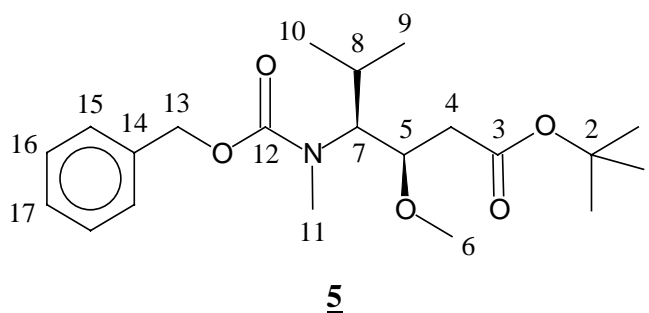
¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 172.44 (C-10), 156.77 (C-3), 136.37 (C-12), 128.36, 127.97, 127.89 (C-13, C-14, C-15), 81.16 (C-2), 68.78,

66.66 (C-6, C-11.), 59.25 (C-5), 39.35 (C-4), 27.92 (C-1), 27.31 (C-7), 20.10, 15.96 (C-8, C-9)

MS: C₁₉H₂₉NO₅ ber. 351.20 gef. (M+H)⁺ = 352 ESI+

Smp.: 65 °C

6.1.3.3 tert.-Butyl-(3*R*,4*S*)-4-[N-(benzyloxycarbonyl)-N-methylamino]-3-methoxy-5-methyl-hexanoat (Z-Dav-OtBu) 5



Zu einer auf –78 °C gekühlten Lösung aus 8.55 mmol Lithiumhexamethyldisilazid in 20 ml THF, hergestellt aus 1.8 ml (8.55 mmol) Hexamethyldisilazan, 4.4 g (7.12 mmol) n-BuLi und 1.6 ml (8.55 mmol) HMPT, wurden unter Argon eine Lösung aus 1.0 g (2.85 mmol) 4 in 10 ml THF zugetropft. Nach 20 Minuten wurden 2.1 ml (12.1 mmol) Trifluormethansulfonsäuremethylester zugegeben und eine Stunde unter Erwärmen auf ca. –50 °C gerührt. Nach der Zugabe von 30 ml 10%iger Citronensäure wurde die wäßrige Phase dreimal mit je 30 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 50 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie über 150 g Kieselgel (H/EE 4:1) erhielt man ein dickflüssiges farbloses Öl.

Ausbeute: 890 mg (82 % der Theorie)

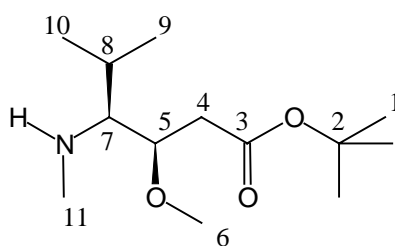
R_f = 0.44 (H/EE 4:1)

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 3:2 vor; 7.34 - 7.24 (m, 5, ar.), 5.19 - 5.45 (m, 2, bz.), 4.09 - 3.75 (m, 2, H-5, H-7), 3.39 (s, 1.8, H-6), 3.30 (s, 1.2, H-6), 2.80 (s, 3, H-11), 2.50 - 2.30 (m, 2, H-4, H-4'), 2.07 - 1.92 (m, 1, H-8), 1.44 (s, 9, H-1), 1.03, 1.00 (d, 1.2, H-9/H-10, ³J = 6.7 Hz), 0.98, 0.95 (d, 1.2, H-9/H-10, ³J = 6.7 Hz), 0.93, 0.90 (d, 1.8, H-9/H-10, ³J = 6.7 Hz), 0.91, 0.88 (d, 1.8, H-9/H-10, ³J = 6.8 Hz)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 171.11, 170.94 (C-12), 157.05, 156.87 (C-3), 141.23, 136.53 (C-14), 128.25, 126.67 (C-15, C-16, C-17), 80.58 (C-2), 67.17, 66.96, 66.85 (C-5, C-7, C-13), 57.64 (C-6), 38.73, 38.41 (C-4, C-11), 27.89 (C-1), 27.61 (C-8), 19.96, 19.71 (C-9, C-10)

MS: C₂₁H₃₃NO₅ ber. 379.24 gef. (M+H)⁺ = 380 ESI+

6.1.3.4 tert. Butyl-(3*R*,4*S*)-4-(*N*-methylamino)-3-methoxy-5-methyl-hexanoat **5a**



5a

Es wurden 1.6 g (4.2 mmol) **5** gemäß AAV 1 entschützt.

Ausbeute: 940 mg (91 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

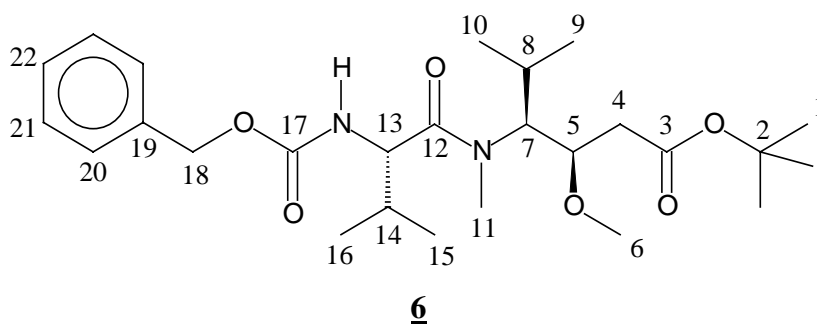
R_f = 0.25 (T/EE 1:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 9.40, 9.16 (br-s, 1, NH), 4.06 - 4.02 (m, 1, H-5), 3.41 (s, 3, H-6), 3.02 (m, 1, H-7), 2.84 (s, 1, H-11), 2.79 - 2.60 (m, 2, H-4', H-4), 2.33 - 2.25 (m, 1, H-8), 1.46 (s, 9, H-1), 1.27, 1.24 (d, 3, H-9/H-10, ³J = 6.8 Hz), 1.17, 1.15 (d, 3, H-9/H-10, ³J = 6.9 Hz)

^{13}C -NMR (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 169.91 (C-3), 81.13 (C-2), 75.57 (C-5), 67.07 (C-6), 57.47 (C-7), 36.47 (C-11), 33.78 (C-4), 27.78 (C-1), 27.64 (C-8), 19.74, 19.42 (C-9, C-10)

MS: $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ ber. 245.20 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 246$ ESI+

6.1.3.5 Z-Val-Dav-OtBu **6**



Zu einer Lösung aus 1.2 g (4.7 mmol) N-(Benzyloxycarbonyl)-*S*-Valin, 760 mg (3.1 mmol) **5a**, 1.2 g (5.1 mmol) TBYCLU in 20 ml CH_2Cl_2 wurden bei 0 °C 1.1 ml (6.2 mmol) DIEA gegeben und 24 Stunden unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde je einmal mit 80 ml 10%iger Citronensäure und mit 80 ml ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie über 100 g Kieselgel (T/EE 8:1) erhielt man ein dickflüssiges Öl.

Ausbeute: 920 mg (62 % der Theorie)

$R_f = 0.41$ (T/EE 2:1)

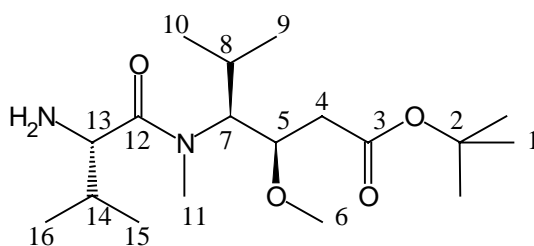
^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis von 3:1 vor; 7.35 - 7.27 (m, 5, ar.), 5.68, 5.66 (br-d, 0.2, NH, $^3J = 9.3$ Hz), 5.60, 5.58 (br-d, 0.8, NH, $^3J = 9.2$ Hz), 5.12 - 5.09 (m, 2, bzL.), 4.76, 4.75, 4.74, 4.73 (dd, 0.2, H-13, $^3J = 5.9$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz), 4.52, 4.51, 4.50, 4.49 (dd, 0.8, H-13, $^3J = 6.0$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz), 3.95 - 3.87 (m, 2, H-5, H-7), 3.42 - 3.34 (m, 3, H-6), 2.98 (s,

0.2, H-11), 2.78 (s, 0.8, H-11), 2.45 - 2.30 (m, 2, H-4), 2.03 - 1.91 (m, 2, H-8, H-14), 1.04 - 0.76 (m, 12, H-9, H-10, H-15, H-16)

^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 171.94 (C-3), 169.67 (C-17), 155.17 (C-12), 135.18 (C-19), 127.09, 126.62, 126.45 (C-20, C-21, C-22), 79.47 (C-2), 79.47 (C-5, C-7), 65.36 (C-6), 56.43 (C-13), 54.72 (C-18), 37.27 (C-4), 29.87, 30.01 (C8, C-14), 29.70 (C-11), 18.95, 18.71, 18.30, 15.83 (C-9, C-10, C-15, C-16)

MS: $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6$ ber. 477.30 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 479$ ESI+

6.1.3.6 Val-Dav-OtBu 7



7

Gemäß AAV 1 wurden 3.8 g (8.0 mmol) 6 entschützt.

Ausbeute: 1.89 g (97 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

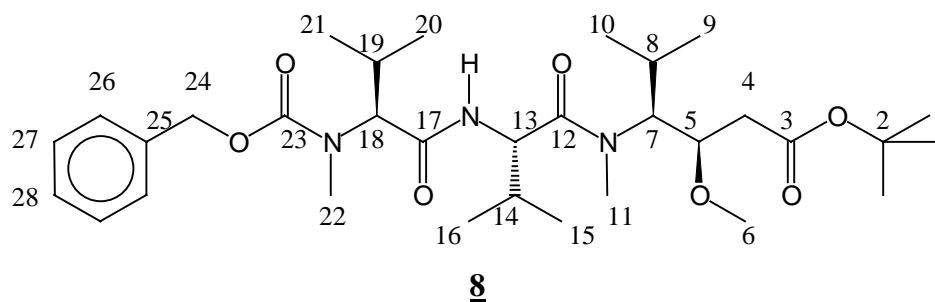
^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 6.41 (br-s, 1, NH), 4.18 - 4.14, 3.90 - 3.86 (m, 2, H-5, H-13), 3.85 - 3.80 (m, 1, H-3), 3.33 (s, 3, H-6), 3.96 (s, 3, H-11), 2.49 - 2.19 (m, 4, H-4, H-4', H-8, H-14), 1.46 (s, 9, H-1), 1.17, 1.15 (d, 3, H-9/H-10/H-15/H-16, $^3J = 6.9$ Hz), 1.06, 1.03 (d, 3, H-9/H-10/H-15/H-16, $^3J = 6.7$ Hz), 1.03, 1.01 (d, 3, H-9/H-10/H-15/H-16, $^3J = 6.5$ Hz), 0.95, 0.92 (d, 3, H-9/H-10/H-15/H-16, $^3J = 6.5$ Hz)

^{13}C -NMR (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 171.46 (C-3), 155.17 (C-12), 80.72 (C-2), 77.86 (C-5), 57.73, 55.64 (C-7, C-13), 38.14 (C-6), 30.49, 30.05 (C-8, C-11),

27.89 (C-1), 27.83, 26.76 (C-4, C-14), 20.27, 19.41, 17.18, 16.51 (C-9, C-10, C-15, C-16)

MS: C₁₈H₃₆NO₄ ber. 344.27 gef. (M+H)⁺ = 345 ESI+

6.1.3.7 Z-Me-Val-Val-Dav-0tBu 8



Gemäß AAV 4 wurden 1.9 g (3.2 mmol) 7, 820 mg (3.5 mmol) N-(Benzyloxycarbonyl)-N-Methyl-S-Valin, 3.4 g (16.1 mmol) PPA (50 %ig in Essigester) und 13.6 ml (880 mmol) DIEA in 15 ml CH₂Cl₂ umgesetzt. Nach säulen-chromatographischer Reinigung (T/EE 8:1) erhielt man ein dickflüssiges farbloses Öl.

Ausbeute: 1.6 g (85 % der Theorie)

R_f = 0.46 (T/EE 1:1)

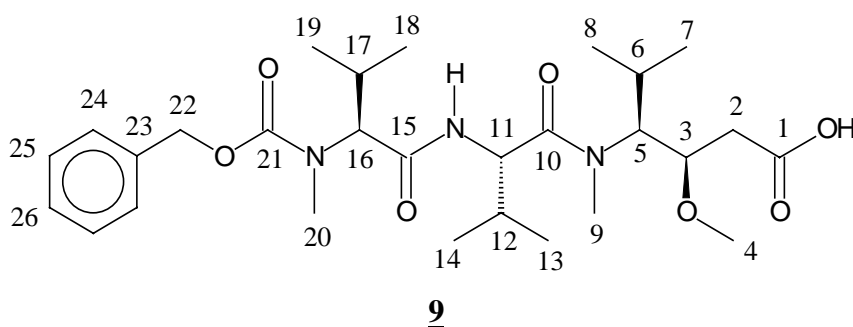
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 7:3 vor; 7.37 - 7.28 (m, 5, ar.), 6.53, 6.51 (br. d, 0.7, NH, ³J = 8.8 Hz), 6.22, 6.20 (br. d, 0.3, NH, ³J = 8.1 Hz), 5.26 - 5.10 (m, 2, bzL.), 4.70 - 4.59 (m, 2, H-13, H-18), 4.17 - 4.14 (m, 1, H-7), 3.94 - 3.87 (m, 1, H-5), 3.35 (s, 3, H-6), 3.00, 2.90 (s, 6, H-11, H-22), 2.46 - 2.19 (m, 2, H-4, H-4'), 2.10 - 1.90 (m, 3, H-8, H-14, H-19), 1.46 (ψ-s, 9, H-1), 1.21 - 0.80 (m, 18, H-9, H-10, H-15, H-16, H-20, H-21)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 173.00, 172.81, 171.09, 171.03, 169.78, 169.54 (C-3, C-12, C-17), 157.16, 156.01 (C-23), 136.61, 136.37 (C-25), 128.66, 128.47, 128.38, 128.33, 128.19, 128.00, 127.89, 127.67 (C-26, C-27, C-28), 80.88,

80.70 (C-2), 78.26, 78.11 (C-5), 67.62, 67.29 (C-24), 65.01, 64.43 (C-7), 58.17, 57.69 (C-6), 53.79, 53.67, 52.83 (C-13, C-18), 38.63, 37.96 (C-4), 31.45, 31.21 (C-11/C-22), 30.89, 30.26 (C-7/C-13/C-18), 29.67, 29.46 (C-11/C-22), 28.00, 27.39 (C-1), 27.05, 26.48, 25.99, 25.78 (C-7/C-13/C-18), 20.67, 20.33, 19.85, 19.67, 19.42, 18.54, 16.41 (C-9, C-10, C-15, C-16, C-20, C-21)

MS: C₃₂H₅₃N₃O₇ ber. 591.39 gef. (M+H)⁺ = 593 ESI+

6.1.3.8 Z-Me-Val-Val-Dav-OH 9



1.3 g (2.2 mmol) 8 wurden analog AAV 2 entschützt. Man erhielt einen farblosen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.0 g (85 % der Theorie)

R_f = 0.28 (T/EE 2:1)

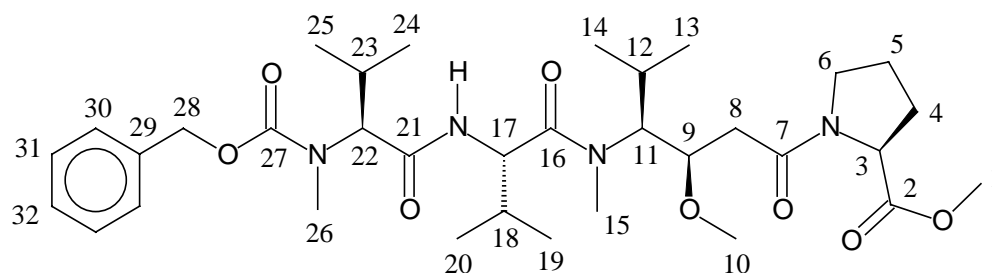
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 11.05 (br. s, 1, COOH), 7.38 - 7.30 (m, 5, ar.), 5.23 - 5.08 (m, 2, bzl.), 4.65 - 4.59 (m, 2, H-11, H-16), 4.23 - 4.08 (m, 1, H-3), 3.92 - 3.79 (m, 1, H-5), 3.35 (s, 3, H-4), 3.07, 2.92 (s, 6, H-9, H-20), 2.59 - 2.46 (m, 2, H-2, H-2'), 2.34 - 1.91 (m, 3, H-6, H-12, H-17), 1.18 - 0.80 (m, 18, H-7, H-8, H-13, H-14, H-18, H-19)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 175.24, 170.62 (C-1, C-21), 157.18 (C-21, C-15), 136.34 (C-23), 128.33, 127.89, 127.54 (C-24, C-25, C-26), 67.45 (C-22),

64.76 (C-5), 57.67 (C-4), 54.49 (C-11, C-16), 36.62 (C-2), 30.59, 29.66 (C-9, C-20), 28.77, 26.65, 26.19 (C-5, C-11, C-16), 22.81, 19.78, 19.04, 18.83, 18.50, 17.91, 10.79 (C-7, C-9, C-13, C-14, C-18, C-19)

MS: C₂₈H₄₅N₃O₇ ber. 535.32 gef. (M+H)⁺ = 537 ESI+

6.1.3.9 Z-Me-Val-Val-Dav-Pro-OMe **10**



10

Analog AAV 4 wurden 1.2 g (2.2 mmol) **9**, 400 mg (2.4 mmol) *S*-Prolinmethylester, 2.3 g (11 mmol) PPA (50 %ig in Essigester) und 9.3 ml DIEA in 30 ml CH₂Cl₂ umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie über 100 g Kieselgel (T/EE 8:1) erhielt man ein dickflüssiges farbloses Öl.

Ausbeute: 1.01 g (71 % der Theorie)

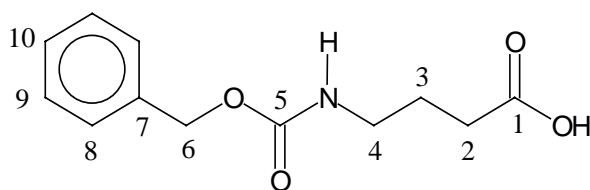
R_f = 0.14 (T/EE 1:1)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 7:4 vor; 7.38 - 7.30 (m, 5, ar.), 6.71, 6.70 (d, 0.6, NH, ³J = 8.4 Hz), 6.57 (br. s, 0.4, NH), 5.22 - 5.11 (m, 2, bz.), 4.67 - 4.46 (m, 3, H-3, H-17, H-22), 4.15, 4.13 (br. d, 1, H-9, ³J = 11.2 Hz), 4.09 - 3.99 (m, 1, H-11), 3.74, 3.72 (ψ-s, 3, H-1), 3.66 - 3.47 (m, 2, H-6, H-6'), 3.38, 3.33 (s, 3, H-10), 3.05, 3.01, 2.90, 2.89 (ψ-s, 6, H-15, H-26), 2.55 - 1.92 (m, 9, H-4, H-4', H-5, H-5', H-8, H-8', H-12, H-18, H-23), 1.12 - 0.80 (m, 18, H-13, H-14, H-19, H-20, H-24, H-25)

^{13}C -NMR (67.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 173.69, 173.21, 172.40, 172.31, 170.67, 170.12 (C-2, C-7, C-16, C-21), 157.32 (C-27), 136.54 (C-29), 128.48, 128.25, 128.00, 127.74 (C-30, C-31, C-32), 79.01, 78.72 (C-9), 67.52, 65.11 (C-3, C-10, C-28), 59.67, 58.91, 58.50, 58.30 (C-11, C-17, C-28), 54.24, 54.07 (C-1), 47.49, 46.73 (C-6), 38.05, 36.81, 31.89, 31.11, 30.81, 30.38, 29.70, 29.26, 27.52, 26.55, 26.08, 24.61, 22.74 (C-4, C-5, C-8, C-12, C-15, C-18, C-23, C-26), 20.93, 20.19, 19.91, 19.73, 19.62, 19.31, 18.57, 17.66, 16.14 (C-13, C-14, C-19, C-20, C-24, C-25)

MS: $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_8$ ber. 646.39 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 648$ ESI+

6.1.3.10 N-(Benzyloxycarbonyl)-4-amino-butansäure **12b**



12b

Zu einer Lösung aus 5.0 g (48.5 mmol) 4-Aminobutansäure in 50 ml 2 M Natronlauge und 50 ml Dioxan wurde bei 0 °C 14 ml (97.0 mmol) Chlorameisensäurebenzylester zugegeben und 24 Stunden unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase einmal mit 50 ml Toluol extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 2 M Salzsäure auf pH 2 eingestellt und fünfmal mit je 30 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde aus 10 ml n-Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 3.70 g (32 % der Theorie) weißer Feststoff

$R_f = 0.49$ (T/EE 2:1)

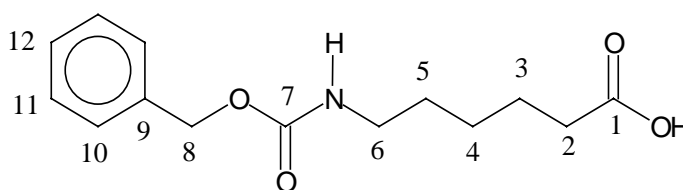
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 7.38 - 7.29 (m, 5, ar.), 5.10 (s, 2, bzI.), 4.93 (br. s, 1, NH), 3.30, 3.27, 3.25 (br. t, 2, H-2), 2.43, 2.40, 2.37 (t, 2, H-4, $^3J = 7.2$ Hz), 1.89, 1.87, 1.84, 1.82, 1.79 (p, 2, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 178.13 (C-5), 156.46 (C-1), 136.29 (C-7), 128.87, 128.00, 127.93 (C-8, C-9, C-10), 66.65 (C-6), 65.68 (C-2), 30.95 (C-4), 24.79 (C-3)

MS: $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ ber. 237.25 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 238$ ESI+

Smp. 66/67°C

6.1.3.11 N-(Benzyloxycarbonyl)-6-amino-hexansäure **12c**



12c

Die Schutzgruppe wurde analog zu **12b** an 5.0 g (38.1 mmol) 6-Aminohexansäure eingeführt. Das Rohprodukt wurde aus n-Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 4.1 g (41 % der Theorie) weißer Feststoff

R_f = 0.48 (T/EE 2:1)

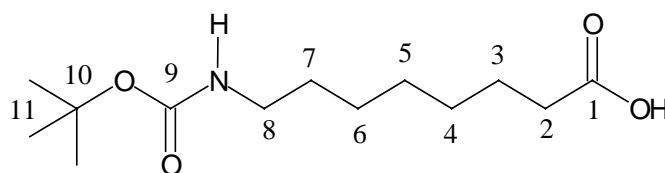
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 9.82 (br. s, 1, COOH), 7.37 - 7.28 (m, 5, ar.), 5.10 (s, 2, bzI.), 4.70 (br. s, 1, NH), 3.18 (br. t, 2, H-2), 2.36, 2.34, 2.31 (t, 2, H-6, $^3J = 7.3$ Hz), 1.70 - 1.32 (m, 6, H-3, H-4, H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 178.77 (C-7), 156.57 (C-1), 136.37 (C-9), 128.35, 127.95, 126.84 (C-12, C-13, C-14), 66.60 (C-8), 64.87 (C-2), 33.72, 29.39, 25.95, 24.13 (C-3, C-4, C-5, C-6)

MS: $C_{14}H_{19}NO_4$ ber. 265.30 gef. $(M+H)^+ = 266$ ESI+

Smp. 59/60°C

6.1.3.12 N-(tert.-Butoxycarbonyl)-8-amino-octansäure 12a



12a

Zu einer Lösung aus 3.2 g (20 mmol) 8-Aminooctansäure in 20 ml 2 M Natronlauge wurden eine Lösung von 6.5 g (30 mmol) Di(tert-butyl)pyrocarbonat in 60 ml Dioxan zugetropft und vier Tage gerührt. Das Dioxan wurde im Vakuum entfernt, die wäßrige Phase mit 2 M Salzsäure auf pH 2 eingestellt und fünfmal mit je 30 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Umkristallisation aus n-Hexan/Essigester erhielt man einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 5.10 g (97 % der Theorie)

$R_f = 0.56$ (H/EE 1:1)

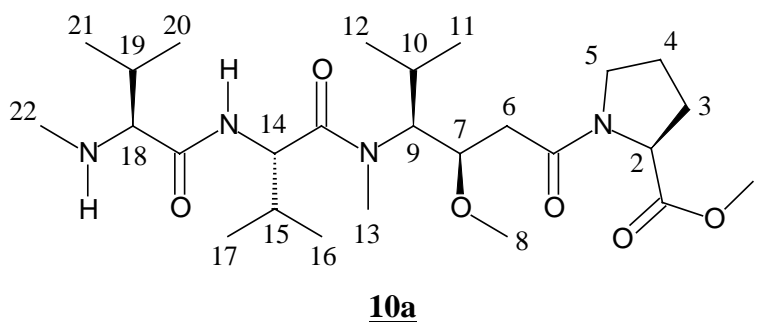
1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): 10.81 (br. s, 1, COOH), 4.85 (br. s, 1, NH), 3.08 (br. t, 2, H-2), 2.35, 2.32, 2.29 (t, 2, H-8, $^3J = 7.4$ Hz), 1.68 -1.55 (m, 2, H-3), 1.44 – 1.27 (m, 8, H-4, H-5, H-6, H-7)

^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): 178.25 (C-9), 155.59 (C-1), 79.10 (C-10), 66.78 (C-2), 33.87, 30.77, 29.70, 28.76, 28.69, 28.19, 24.47 (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-11)

MS: $C_{13}H_{25}NO_4$ ber. 259.34 gef. $(M+H)^+ = 260$ ESI+

Smp. 66 °C

6.1.3.13 Me-Val-Val-Dav-Pro-OMe 10a



Gemäß AAV 1 wurden 800 mg (1.2 mmol) **10** entschützt. Man erhielt einen weißen amorphen Feststoff.

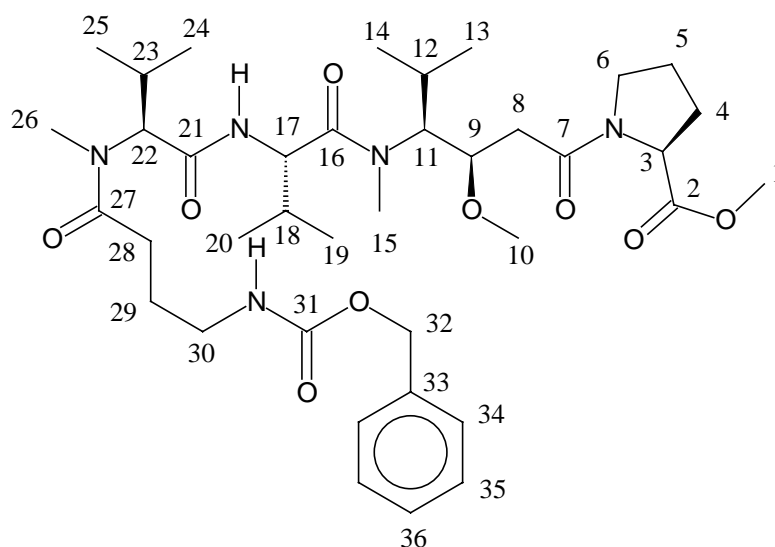
Ausbeute: 520 mg (84 % der Theorie)

$R_f = 0.21$ (T/EE 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 8.01, 7.97 (br. d, 1, NH, $^3J = 8.4$ Hz), 4.72 - 4.47 (m, 3, H-2, H-7, H-14), 4.01, 3.87 (m, 1, H-9), 3.71 - 3.52 (m, 6, H-1, H-5, H-5', H-18), 3.30, 3.26 (s, 3, H-8), 2.90, 2.89 (ψ -s, 3, H-13), 2.61 (s, 3, H-22), 2.51 - 1.87 (m, 9, H-3, H-3', H-4, H-4', H-6, H-6', H-10, H-15, H-19), 1.08 - 0.72 (m, 18, H-11, H-12, H-16, H-17, H-20, H-21)

MS: $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_6$ ber. 512.30 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 514$ ESI+

6.1.3.14 N-(Benzyloxycarbonyl)-4-Aminobutansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro-OMe **13b**

**13b**

Analog zur AAV 4 wurden 500 mg (0.98 mmol) **10a**, 255 mg (1.1 mmol) **12b**, 1.0 g (4.9 mmol) PPA (50%ig in Essigester) und 4.0 ml DIEA in 10 ml CH₂Cl₂ umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie über 100 g Kieselgel (T/EE 1:1) erhielt man ein dickflüssiges farbloses Öl.

Ausbeute: 510 mg (71 % der Theorie)

R_f = 0.34 (T/EE 1:3)

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 7.33 - 7.29 (m, 5, ar.), 6.66, 6.63 (br. d, 1, NH, ³J = 9.1 Hz), 5.29 - 5.15 (br. s, 1, NH), 5.08 (s, 2, bzL.), 4.63 - 4.33 (m, 3, H-3, H-17, H-22), 3.99 - 3.98 (m, 1, H-9), 3.72 - 3.15 (m, 9, H-1, H-6, H-6', H-10, H-11), 3.05 - 2.82 (m, 8, H-15, H-26, H-28), 2.51 - 1.72 (m, 13, H-4, H-4', H-5, H-5', H-8, H-8', H-12, H-18, H-23, H-29, H-30), 1.06 - 0.72 (m, 18, H-13, H-14, H-19, H-20, H-24, H-25)

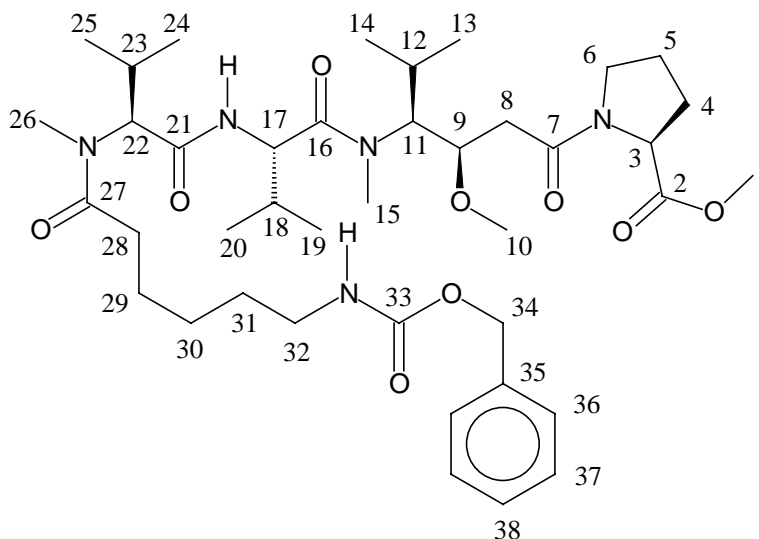
¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 174.12, 172.45, 170.23, 169.79 (C-2, C-7, C-16, C-21, C-27), 156.47 (C-31), 136.78 (C-33), 128.77, 127.48, 127.31 (C-34, C-35,

C-36), 77.89 (C-9), 65.93, 61.99, 59.22, 58.42 (C-3, C-10, C-11, C-17, C-22, C-32), 54.07, 51.82, 51.65 (C-1, C-28), 47.10 (C-6), 40.74, 34.04, 32.86, 30.98, 30.76, 29.62, 29.11, 28.23, 26.34, 24.78, 24.46 (C-4, C-5, C-8, C-12, C-15, C-18, C-23, C-26, C-29, C-30), 20.07, 19.55, 19.17, 18.37, 17.61 (C-13, C-14, C-19, C-20, C-24, C-25)

MS: C₃₈H₆₁N₅O₉ ber. 731.93 gef. (M+H)⁺ = 733 ESI+

6.1.3.15 N-(Benzyloxycarbonyl)-6-Aminohexansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro-OMe

13c



13c

Analog zur AAV 4 wurden 500 mg (0.98 mmol) **10a**, 285 mg (1.1 mmol) **12c**, 1.0 g (4.9 mmol) PPA (50 %ig in Essigester) und 4.0 ml DIEA in 10 ml CH₂Cl₂ umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie über 100 g Kieselgel (T/EE 1:1) erhielt man ein dickflüssiges Öl.

Ausbeute: 630 mg (85 % der Theorie)

R_f = 0.33 (T/EE 1:3)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 4:1 vor; 7.40 - 7.32 (m, 5, ar.), 6.88, 6.84 (br. d, 0.2, NH, ³J = 9.0

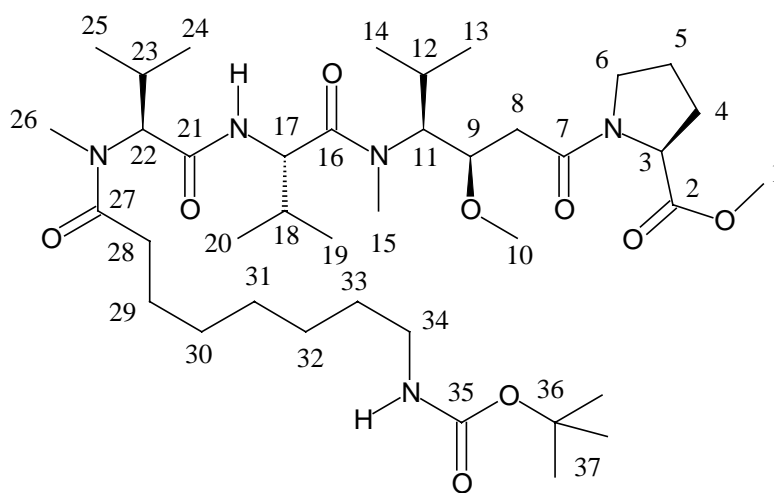
Hz), 6.66, 6.62 (br. d, 0.8, NH, $^3J = 9.3$ Hz), 5.11 (s, 2, bzl.), 4.99 - 4.87 (br. s, 1, NH), 4.74 - 4.42 (m, 3, H-3, H-17, H-22), 4.06 - 3.97 (m, 1, H-9), 3.76 - 3.54 (m, 4, H-1, H-11), 3.50 - 3.43 (m, 2, H-6, H-6'), 3.33 (s, 3, H-10), 3.24, 3.21, 3.19, 3.16 (dd, 2, H-28, H-28'), 3.08, 2.99, 2.93 (ψ -s, 6, H-15, H-26), 2.54 - 1.89 (m, 9, H-4, H-4', H-5, H-5', H-8, H-8', H-12, H-18, H-23), 1.72 - 1.32 (m, 6, H-29 bis H-31), 1.12 - 0.77 (m, 18, H-13, H-14, H-19, H-20, H-24, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 173.85, 172.43, 172.13, 169.98 (C-2, C-7, C-16, C-21, C-27), 157.03 (C-33), 136.98 (C-35), 129.24, 128.78, 127.74 (C-36, C-37, C-38), 77.77 (C-9), 67.01, 63.94, 59.72, 58.02 (C-3, C-10, C-11, C-17, C-22, C-34), 52.89, 52.52, 51.79 (C-1, C-28), 46.78 (C-6), 41.85, 32.94, 32.46, 31.98, 29.67, 29.06, 27.48, 25.77, 24.78, 24.46 (C-4, C-5, C-8, C-12, C-15, C-18, C-23, C-26, C-29 bis C-32), 19.99, 19.25, 19.10, 18.37, 17.51 (C-13, C-14, C-19, C-20, C-24, C-25)

MS: $\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_9$ ber. 759.98 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 761$ ESI+

6.1.3.16 N-(tert.-Butoxycarbonyl)-8-Aminooctansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro-OMe

13a



13a

Analog zur AAV 4 wurden 1.6 g (2.3 mmol) **10a**, 700 mg (2.5 mmol) **12a**, 2.5 g (9.9 mmol) PPA (50 %ig in Essigester) und 4 ml DIEA in 20 ml CH₂Cl₂ umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie über 100 g Kieselgel (T/EE 1:2 bis EE) erhielt man ein dickflüssiges Öl.

Ausbeute: 1.6 g (92 % der Theorie)

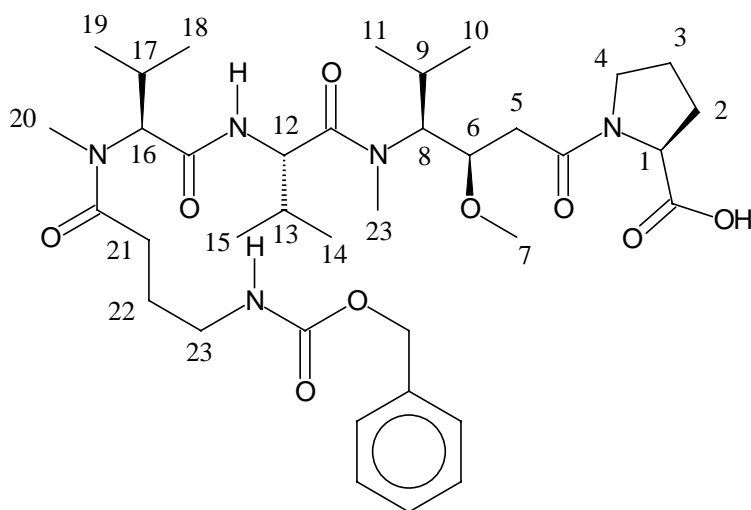
R_f = 0.30 (T/EE 1:2)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 4:1 vor; 6.88, 6.84 (br. d, 0.2, NH, ³J = 9.0 Hz), 6.70, 6.66 (br. d, 0.8, NH, ³J = 9.3 Hz), 4.74 - 4.42 (m, 4, H-3, H-17, H-22, NH), 4.05 - 3.95 (m, 1, H-9), 3.72 - 3.56 (m, 4, H-1, H-11), 3.48 - 3.42 (m, 2, H-6, H-6'), 3.40 (s, 3, H-10), 3.12, 3.04 (m, 2, H-28, H-28'), 3.00, 2.89 (ψ-s, 6, H-15, H-26), 2.55 - 1.87 (m, 9, H-4, H-4', H-5, H-5', H-8, H-8', H-12, H-18, H-23), 1.67 - 1.53 (m, 2, H-29), 1.45 (s, 9, H-37), 1.38 - 1.75 (m, 10, H-29 bis H-33), 1.14 - 0.78 (m, 18, H-13, H-14, H-19, H-20, H-24, H-25)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 174.05, 172.33, 170.13, 169.83 (C-2, C-7, C-16, C-21, C-27), 80.47 (C-36), 78.31 (C-9), 66.23, 62.04, 58.62, 58.02 (C-3, C-10, C-11, C-17, C-22), 53.79, 52.32, 51.89 (C-1, C-28), 47.10 (C-6), 40.85, 33.94, 33.46, 30.98, 30.52, 29.67, 29.06, 28.80, 27.48, 26.34, 25.77, 24.78, 24.46 (C-4, C-5, C-8, C-12, C-15, C-18, C-23, C-26, C-29 bis C-34, C-37), 20.07, 19.55, 19.17, 18.37, 17.61 (C-13, C-14, C-19, C-20, C-24, C-25)

MS: C₃₉H₇₁N₅O₉ ber. 754.02 gef. (M+H)⁺ = 755 ESI+

6.1.3.17 N-(Benzyloxycarbonyl)-4-Aminobutansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro **14b**



14b

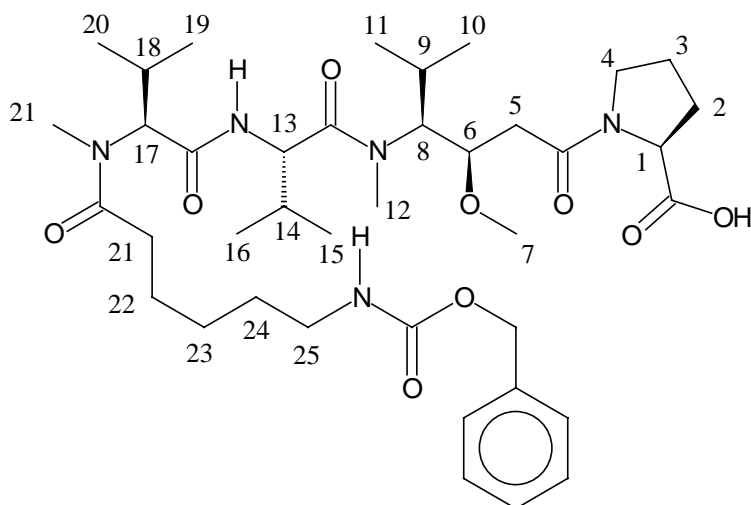
Es wurden gemäß AAV 3 510 mg (0.7 mmol) **13b** entschützt.

Ausbeute: 450 mg (90 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

$R_f = 0.49$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 7.38 - 7.29 (m, 5, ar.), 6.88, 6.84 (br. d, 1, NH, $^3J = 9.1$ Hz), 5.38 - 5.21 (br. s, 1, NH), 5.08 (s, 2, bz.), 4.69 - 4.45 (m, 3, H-1, H-12, H-16), 4.04 - 3.96 (m, 1, H-6), 3.71 - 3.52 (m, 3, H-4, H-4', H-8), 3.48 - 3.08 (m, 5, H-7, H-21), 3.02 - 2.87 (m, 8, H-20, H-22, H-23), 2.61 - 1.81 (m, 11, H-2, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5', H-9, H-13, H-17, H-21), 1.02 - 0.75 (m, 18, H-10, H-11, H-14, H-15, H-18, H-19)

MS: $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{N}_5\text{O}_9$ ber. 717.90 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 718$ ESI-

6.1.3.18 N-(Benzyloxycarbonyl)-6-Aminohexansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro 14c**14c**

Analog zur AAV 3 wurden 630 mg (0.83 mmol) **13c** entschützt.

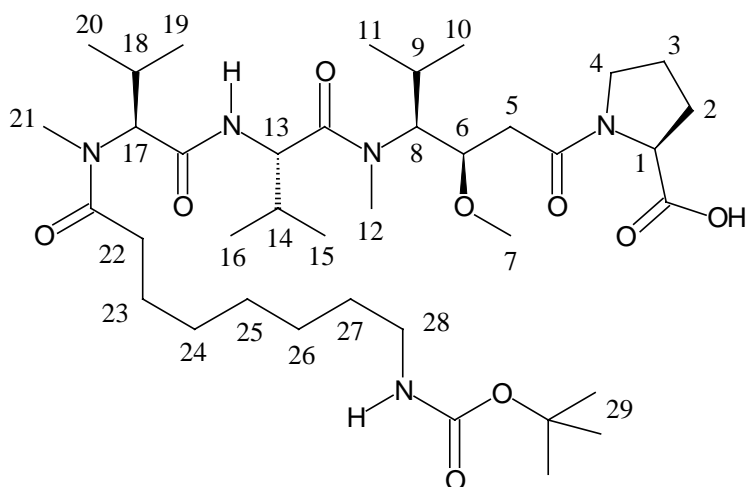
Ausbeute: 580 mg (94 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

$R_f = 0.42$ (CH₂Cl₂/Methanol 9:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 4:1 vor; 7.36 - 7.27 (m, 5, ar.), 6.84, 6.80 (br. d, 0.2, NH, ³J = 9.0 Hz), 6.71, 6.67 (br. d, 0.8, NH, ³J = 9.3 Hz), 5.02 (s, 3, bzl., NH), 4.62 - 4.47 (m, 3, H-1, H-13, H-17), 3.96 - 3.89 (m, 1, H-6), 3.62 - 3.54 (m, 1, H-8), 3.48 - 3.42 (m, 2, H-4, H-4'), 3.28 (s, 3, H-7), 3.18, 3.15, 3.14, 3.11 (dd, 2, H-21, H-21'), 2.99, 2.93 (ψ-s, 6, H-12, H-21), 2.54 - 1.89 (m, 9, H-2, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5', H-9, H-14, H-18), 1.68 - 1.28 (m, 6, H-22 bis H-25), 1.04 - 0.68 (m, 18, H-10, H-11, H-15, H-16, H-19, H-20)

MS: C₃₉H₆₃N₅O₉ ber. 745.96 gef. (M+H)⁺ = 746 ESI-

6.1.3.19 N-(tert.-Butoxycarbonyl)-8-Aminooctansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro **14a**



14a

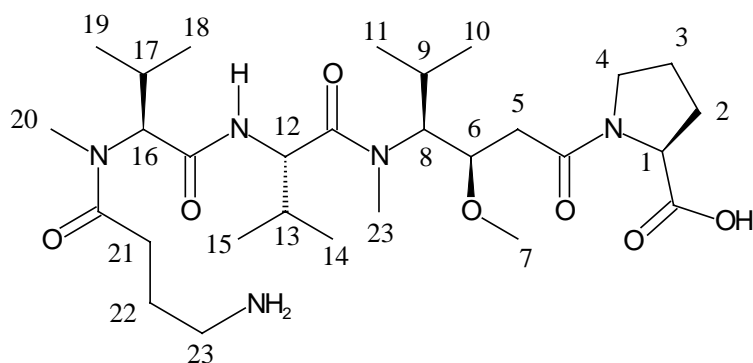
Analog zur AAV 3 wurden 890 mg (1.2 mmol) **13a** entschützt.

Ausbeute: 650 mg (74 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

$R_f = 0.53$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 4:1 vor; 6.62, 6.58 (br. d, 0.8, NH, $^3J = 8.9$ Hz), 6.39, 6.35 (br. d, 0.2, NH, $^3J = 9.3$ Hz), 4.72 - 4.42 (m, 4, H-1, H-13, H-17, NH), 4.05 - 3.93 (m, 1, H-6), 3.66 - 3.56 (m, 1, H-8), 3.52 - 3.42 (m, 2, H-4, H-4'), 3.38 (s, 3, H-7), 3.18 - 3.02 (m, 2, H-22, H-22'), 2.99 (ψ -s, 6, H-12, H-21), 2.65 - 1.89 (m, 9, H-2, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5', H-9, H-14, H-18), 1.69 - 1.55 (m, 2, H-23), 1.49 (s, 9, H-29), 1.38 - 1.07 (m, 10, H-24 bis H-28), 1.08 - 0.71 (m, 18, H-10, H-11, H-15, H-16, H-19, H-20)

MS: $\text{C}_{38}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{O}_9$ ber. 739.99 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 739$ ESI-

6.1.3.20 4-Aminobutansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro 15b**15b**

Es wurden gemäß AAV 1 370 mg (0.5 mmol) **14b** entschützt und anschließend HPLC-chromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 320 mg (97 % der Theorie) weißer Feststoff

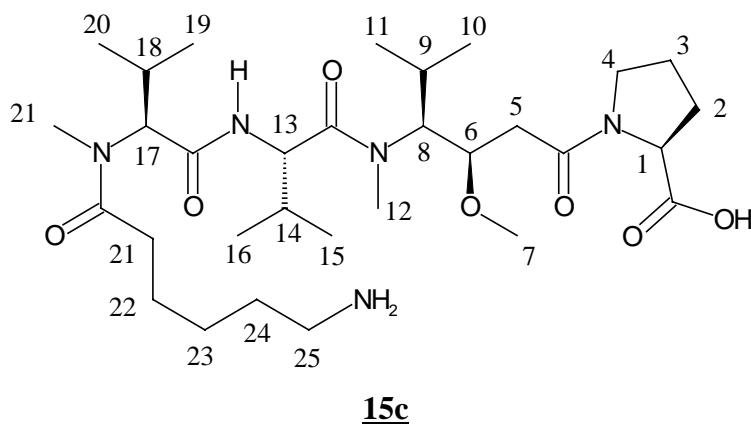
$R_f = 0.30$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 4:1)

$R_t = 20.31$ min. (Säule A, Gradient 1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 1:1 vor, TFA-Salz; 8.45, 8.41 (br. d, 0.5, NH, $^3J = 7.8$ Hz), 8.02 - 7.57 (br. s, 2, NH_2), 7.62, 7.58 (br. d, 0.5, NH, $^3J = 7.7$ Hz), 4.42 - 4.04 (m, 3, H-1, H-12, H-16), 4.04 - 3.93 (m, 1, H-6), 3.78 - 3.57 (m, 2, H-4, H-4'), 3.38 - 2.89 (m, 8, H-7, H-8, H-21, H-21'), 2.87 - 2.11 (m, 9, H-5, H-5', H-20, H-22, H-23), 2.02 - 1.51 (m, 9, H-2, H-2', H-3, H-3', H-9, H-13, H-17, H-21), 0.82 - 0.48 (m, 18, H-10, H-11, H-14, H-15, H-18, H-19)

MS: $\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_7$ ber. 583.76 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 585$ ESI+

6.1.3.21 6-Aminohexansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro **15c**



Analog zur AAV 1 wurden 410 mg (0.55 mmol) **14c** entschützt und anschließend mittels HPLC gereinigt.

Ausbeute: 400 mg (95 % der Theorie) weißer Feststoff

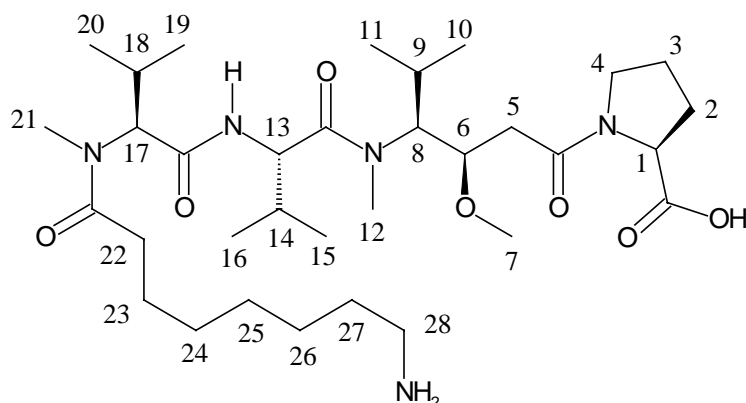
$R_f = 0.15$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 4:1)

$R_t = 19.88$ min. (Säule A, Gradient 1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 1:1 vor, TFA-Salz; 8.34, 8.31 (br. d, 0.5, NH, $^3J = 8.0$ Hz), 8.01 – 7.42 (br. s, 1, NH_2), 7.52, 7.49 (br. d, 0.5, NH, $^3J = 8.1$ Hz), 4.42 - 4.07 (m, 3, H-1, H-13, H-17), 4.01 - 3.95 (m, 1, H-6), 3.78 - 3.64 (m, 1, H-8), 3.32 - 2.99 (m, 7, H-4, H-4', H-7, H-21), 2.81 - 2.45 (m, 8, H-12, H-21, H-25), 2.38 - 1.56 (m, 9, H-2, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5', H-9, H-14, H-18), 1.42 - 1.04 (m, 6, H-22 bis H-24), 0.79 - 0.44 (m, 18, H-10, H-11, H-15, H-16, H-19, H-20)

MS: $\text{C}_{31}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_7$ ber. 611.82 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 613$ ESI+

6.1.3.22 8-Aminooctansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro **15a**



15a

Methode 1: 230 mg (0.31 mmol) **14a** wurden in 3 ml CH₂Cl₂ gelöst und bei 0 °C mit 1 ml TFA versetzt und 18 Stunden unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 20 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach anschließender HPLC-Aufreinigung erhielt man einen weißen Feststoff.

Methode 2: 450 mg (0.61 mmol) **14a** wurden in 5 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit 5 ml Reagenz K, bestehend aus 82.5 % TFA, 5 % H₂O, 5 % Thioanisol, 5 % Phenol und 2.5 % Ethandithiol, bei 0 °C versetzt und 18 Stunden unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe 50 ml Toluol wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 60 mg (30 % der Theorie) Methode 1

120 mg (31 % der Theorie) Methode 2

$R_f = 0.66$ (CH₂Cl₂/Methanol 4:1)

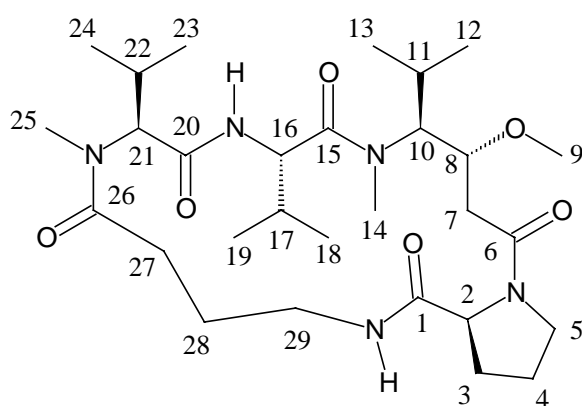
$R_t = 23.84$ min. (Säule B, Gradient 1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 1:1 vor, TFA-Salz; 8.52, 8.50 (br. d, 0.5, NH, ³J = 8.5 Hz), 7.68 - 7.50 (br. m, 2.5, NH, NH₂), 4.62 - 4.39 (m, 3, H-1, H-13, H-17), 4.26 - 4.18 (m,

1, H-6), 4.02 - 3.85 (m, 1, H-8), 3.56 - 3.54 (m, 2, H-4, H-4'), 3.22 (s, 3, H-7), 3.08 - 2.75 (m, 8, H-12, H-21, H-22, H-22'), 2.49 - 1.76 (m, 9, H-2, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5', H-9, H-14, H-18), 1.55 - 1.27 (m, 2, H-24 bis H-28), 0.91 - 0.71 (m, 18, H-10, H-11, H-15, H-16, H-19, H-20)

MS: C₃₃H₆₁N₅O₇ ber. 639.87 gef. (M+H)⁺ = 641 ESI-

6.1.3.23 cyclo-(4-Aminobutansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro) **16b**



16b

200 mg (0.34 mmol) **15b** in 340 ml DMF wurden mit 233 µL (1.4 mmol) DIEA versetzt und eine Stunde bei 0 °C gerührt. Nach der Zugabe von 138 mg (1.0 mmol) HOBT und 330 mg (1.0 mmol) TBTU in 6 ml DMF wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 60 mg (30 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

R_f = 0.50 (CH₂Cl₂/Methanol 9:1)

R_t = 29.47 min. (Säule A, Gradient 1)

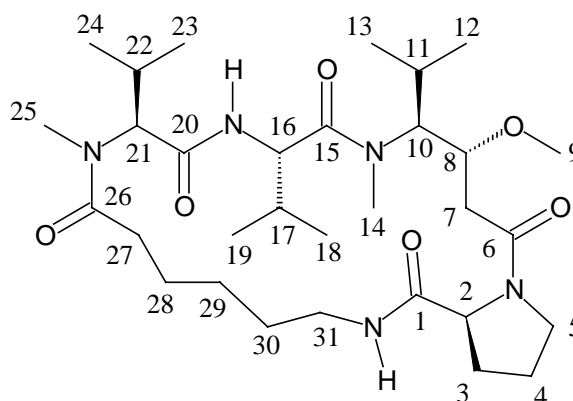
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form von vier Konformeren vor, deren Verhältnis wegen Überlagerung nicht bestimmt werden konnte; 8.38, 8.36, 7.88, 7.40, 6.87, 6.74 (NH), 5.05, 4.83 (H-21), 4.68, 4.21 (H-8), 4.63, 4.45,

4.37 (H-2), 4.59, 4.58 (H-16), 3.78, 3.69, 3.67, 3.44 (H-27), 3.56, 3.65, 3.63 (H-5), 3.55, 3.51 (H-10), 3.38, 3.37 (H-9), 3.15, 3.05 (H-14), 3.06, 3.04, 2.79, 2.54 (H-29), 3.03, 2.99 (H-25), 2.68, 2.48 (H-7), 2.36, 2.16 (H-22), 2.31, 1.77 (H-11), 2.09, 2.06 (H-17), 2.32, 2.28 (H-4), 2.09, 2.08, 1.96, 1.94, 1.83 (H-3), 2.05, 1.95, 1.91, 1.85 (H-28), 1.21, 1.03, 0.90, 0.88 (H-12, H-13), 1.15, 0.99, 0.89, 0.77 (H-23, H-24), 1.03, 1.00 (H-18, H-19)

^{13}C -NMR (150.9 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 175.97 (C-26), 173.45 (C-1), 170.61 (C-6), 170.24 (C-15), 170.09 (C-20), 80.37 (C-8), 80.30 (C-10), 67.10 (C-21), 59.67 (C-2), 57.65 (C-9), 56.45 (C-27), 55.07 (C-16), 46.93 (C-5), 40.03 (C-14), 34.40 (C-7), 29.92 (C-29), 28.89 (C-22), 28.86 (C-25), 28.69 (C-11), 28.02 (C-3), 25.83 (C-17), 23.45 (C-28), 23.27 (C-4), 18.95 (C-19), 18.91 (C-12), 18.16 (C-24), 17.32 (C-18), 17.28 (C-23), 17.20 (C-13)

MS: $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_6$ ber. 565.75 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 567$ ESI+

6.1.3.24 cyclo-(4-Aminohexansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro) **16c**



16c

Es wurden 200 mg (0.33 mmol) **15c** analog zu **16b** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 150 mg (77 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

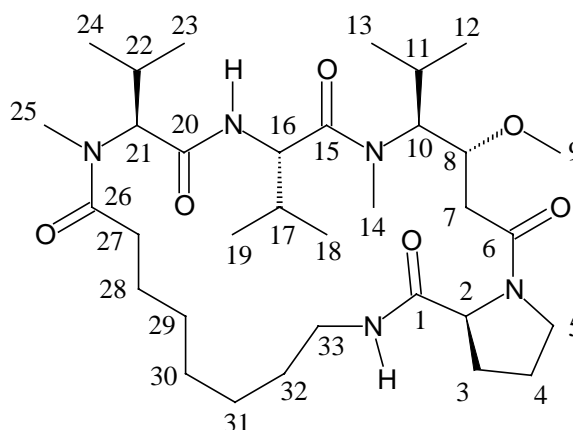
R_f = 0.61 (CH₂Cl₂/Methanol 9:1)

R_t = 30.60 min. (Säule A, Gradient 1)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form von vier Konformeren vor, deren Verhältnis wegen Überlagerung nicht bestimmt werden konnte; 8.86, 7.98, 7.92, 7.55, 7.41, 7.35, 7.20, 6.99 (NH), 5.21, 4.51, 4.16 (H-21), 4.77, 4.26, 4.16 (H-8), 4.65, 4.60, 4.47 (H-2), 4.70, 4.59, 4.54, 4.52 (H-16), 3.50, 3.41, 3.39, 3.33 (H-27), 3.65, 3.64, 3.60, 3.44, 3.43 (H-5), 4.07, 3.91, 3.88 (H-10), 3.38, 3.36, 3.35 (H-9), 3.15, 3.14, 3.09 (H-14), 3.17, 3.13, 3.09, 3.05 (H-31), 3.05, 2.97, 2.96 (H-25), 2.56, 2.52, 2.48, 2.42 (H-7), 2.12, 2.09, 2.07 (H-22), 2.11, 2.09, 1.89 (H-11), 2.12, 2.08, 2.06 (H-17), 2.41, 2.16 (H-4), 2.08, 2.01, 1.95, 1.90, 1.89, 1.86 (H-3), 1.73, 1.62, 1.54 (H-28, H-30), 1.43, 1.39, 1.38, 1.36 (H-29), 1.07, 0.98, 0.97, 0.85, 0.76, 0.73 (H-12, H-13), 0.96, 0.93, 0.79, 0.72 (H-23, H-24), 0.95, 0.94, 0.92, 0.91, 0.89, 0.85 (H-18, H-19)

¹³C-NMR (150.9 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 176.02 (C-26), 172.75 (C-1), 169.89 (C-6), 168.24 (C-15), 167.99 (C-20), 69.42 (C-8), 68.01 (C-10), 66.89 (C-21), 59.62 (C-2), 53.65 (C-9), 52.75 (C-27), 52.09 (C-16), 47.41 (C-5), 39.86 (C-14), 36.43 (C-7), 28.96 (C-31), 27.99 (C-22), 27.86 (C-25), 27.69 (C-11), 27.02 (C-3), 26.83 (C-17), 25.68 (C-30), 22.65 (C-28), 22.97 (C-4), 21.77 (C-29), 19.03 (C-19), 18.81 (C-12), 18.32 (C-24), 17.89 (C-18), 17.78 (C-23), 16.79 (C-13)

MS: C₃₁H₅₅N₅O₆ ber. 593.80 gef. (M+H)⁺ = 595 ESI+

6.1.3.25 cyclo-(4-Aminooctansäure-Me-Val-Val-Dav-Pro) 16a**16a**

Es wurden 100 mg (0.16 mmol) **15a** analog zu **16b** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 80 mg (81 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

$R_f = 0.50$ (CH_2Cl_2 /Methanol 9:1)

$R_t = 32.07$ min. (Säule A, Gradient 1)

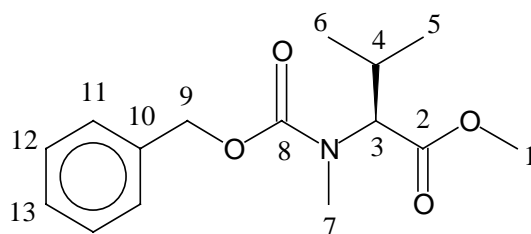
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form von fünf Konformeren vor, deren Verhältnis wegen Überlagerung nicht bestimmt werden konnte; 8.10, 7.20, 6.94, 6.64, 6.48, 6.42, 6.35 (NH), 3.85 (H-21), 4.32, 4.19 (H-8), 4.65, 4.52, 4.44 (H-2), 5.13, 4.87, 4.85, 4.46 (H-16), 3.54, 3.48, 3.30 (H-27), 3.66, 3.65, 3.46 (H-5), 3.99, 3.98 (H-10), 3.28 (H-9), 2.93 (H-14), 3.14, 3.05, 2.45 (H-33), 2.86 (H-25), 2.53, 2.52, 2.36, 2.32 (H-7), 2.41 (H-22), 2.18 (H-11), 2.13, 2.09, 2.08, 2.05 (H-17), 2.32, 2.29, 2.24, 2.13, 2.06 (H-4), 2.06, 2.00, 1.98 (H-3), 1.62, 1.43 (H-28, H-32), 1.44, 1.42, 1.33 (H-29, H-31), 1.28, 1.27, 1.25 (H-30), 1.06, 0.91, 0.83 (H-12, H-13), 1.01, 0.85 (H-23, H-24), 1.09, 1.08, 1.06, 1.04, 1.03, 0.91, 0.90, 0.88 (H-18, H-19)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.9 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 176.89 (C-26), 175.73 (C-1), 171.23 (C-6), 171.00 (C-15), 170.83 (C-20), 69.32 (C-8), 68.33 (C-10), 68.10 (C-21),

60.21 (C-2), 59.77 (C-9), 57.65 (C-27), 56.01 (C-16), 49.04 (C-5), 41.56 (C-14), 31.39 (C-7), 29.99 (C-33), 28.39 (C-22), 28.26 (C-25), 28.19 (C-11), 27.02 (C-3), 26.83 (C-17), 25.45 (C-28), 24.93 (C-4), 21.77 (C-32), 20.54 (C-29), 20.22 (C-31), 19.44 (C-30), 19.43 (C-19), 19.11 (C-12), 18.79 (C-24), 18.32 (C-18), 17.69 (C-23), 17.01 (C-13)

MS: C₃₃H₅₉N₅O₆ ber. 621.86 gef. (M+H)⁺ = 623 ESI+

6.1.3.26 N-Methyl-N-(benzyloxycarbonyl)-S-Valinmethylester **18**



18

Bei -10 °C wurden zu 3.3 ml (82 mmol) Methanol 0.87 ml (12 mmol) Thionylchlorid vorsichtig zugetropft, so daß die Temperatur -5 °C nicht überstieg.. Nach 10 Minuten wurden 2.7 g (10 mmol) N-(Benzyloxycarbonyl)-N-methyl-S-Valin portionsweise zugegeben. Nachdem es sich aufgelöst hatte, wurde zwei Stunden unter Rückfluß erwärmt, bis die Gasentwicklung unterblieb. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml Essigester aufgenommen, einmal mit 20 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt ein gelbliches Öl.

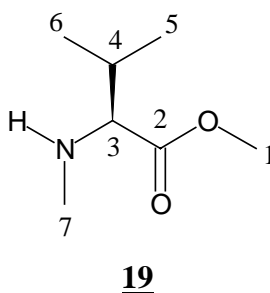
Ausbeute: 2.5 g (90 % der Theorie)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 7.35 - 7.27 (m, 5, ar.), 5.16 (s, 2, bzL.), 4.54, 4.49 (d, 1, H-3, ³J = 10.6 Hz), 3.73 (s, 3, H-1), 2.91 (ψ-s, 3, H-3), 2.27 - 2.09 (m, 1, H-4), 0.96, 0.94 (d, 3, H-5/H-6, ³J = 6.8 Hz), 0.95, 0.92 (d, 3, H-5/H-6, ³J = 6.8 Hz)

^{13}C -NMR (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 171.59 (C-2), 156.84 (C-8), 136.49 (C-10), 128.58, 128.32, 127.60 (C-11, C-12, C-13), 69.29 (C-1), 67.32 (C-9), 63.66 (C-3), 51.64 (C-7), 35.21 (C-4), 19.46, 18.60 (C-5, C-6)

MS: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ ber. 279.15 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 280$ ESI+

6.1.3.27 N-Methyl-S-Valinmethylester **19**



Zu einer Lösung von 7.6 g (31 mmol) **18** in 100 ml Essigsäure wurden bei 0 °C 20 ml HBr (5.7 M in Eisessig) zugetropft und eine Stunde bei 0 °C und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt, bis die Gasentwicklung beendet war. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand aus 15 ml Diethylether umkristallisiert.

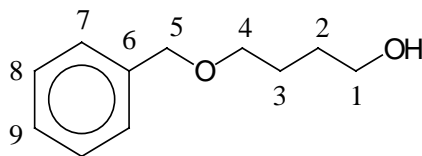
Ausbeute: 8.2 g als Hydrobromid (99 % der Theorie) weißer Feststoff

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): als Hydrobromid; 5.16, 5.13 (br. d, 1, NH, $^3\text{J} = 7.6$ Hz), 3.86 (s, 3, H-1), 3.63, 3.61 (d, 1, H-3, $^3\text{J} = 4.4$ Hz), 2.78 (s, 3, H-7), 2.68 - 2.55 (m, 1, H-4), 1.10, 1.17 (d, 3, H-5, H-6, $^3\text{J} = 7.0$ Hz), 1.15, 1.13 (d, 3, H-5, H-6, $^3\text{J} = 6.9$ Hz)

^{13}C -NMR (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): als Hydrobromid; 167.30 (C-2), 67.14 (C-3), 52.87 (C-1), 32.77, 29.43 (C-4, C-7), 19.71, 17.65 (C-5, C-6)

MS: $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2$ ber. 145.11 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 146$ ESI+

Smp.: 126 °C

6.1.3.28 1-Benzyl-4-butanol 21a

Methode 1:

5.0 g (55.5 mmol) 1,4-Butandiol in 150 ml Acetonitril wurden mit 3.8 g (27.8 mmol) K_2CO_3 und 1.65 ml (13.9 mmol) Benzylbromid unter Sieden zwei Tage erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 2 M Salzsäure aufgenommen. Es wurde fünfmal mit je 80 ml Essigester extrahiert, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (H/EE 9:1 bis 2:1) erhielt man eine farblose Flüssigkeit von geringer Viskosität.

Ausbeute: 1.80 g (72 % der Theorie)

Methode 2:

Zu einer Lösung von 5.0 g (55.5 mmol) 1,4-Butandiol in 150 ml THF wurden bei 0 °C 1.1 g (27.8 mmol) NaH (60 %ige Dispersion auf Mineralöl) zugegeben und 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 1.65 ml (13.9 mmol) Benzylbromid zugetropft und zwei Tage unter Sieden erhitzt. Die Lösung wurde mit 200 ml 2 M Salzsäure versetzt und dreimal mit 80 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit H/EE 9:1 bis 2:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 2.30 g (92 % der Theorie)

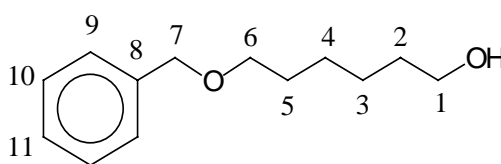
$R_f = 0.40$ (T/EE 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 7.39 - 7.29 (m, 5, ar.), 4.52 (s, 2, bzl.), 3.61 (m, 2, H-1), 3.54, 3.51, 3.49 (t, 2, H-4, $^3J = 5.8$ Hz), 1.73 - 1.63 (m, 4, H-2, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 138.03 (C-6), 128.26, 127.57, 127.51 (C-7, C-8, C-9), 72.86 (C-1), 70.18 (C-4), 62.34 (C-5), 29.99, 26.54 (C-2, C-3)

MS: $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$ ber. 180.24 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 181$ ESI+

6.1.3.29 1-Benzyl-oxy-6-hexanol **21b**



a) 4.7 g (40 mmol) 1,6-Hexadiol wurden nach Methode 1 analog zu **21b** umgesetzt.

Man erhielt eine farblose Flüssigkeit von geringer Viskosität.

Ausbeute: 1.0 g (48 % der Theorie)

b) 10.0 g (85 mmol) 1,6-Hexadiol wurden nach Methode 2 analog zu **21b** umgesetzt.

Ausbeute: 3.5 g (80 % der Theorie)

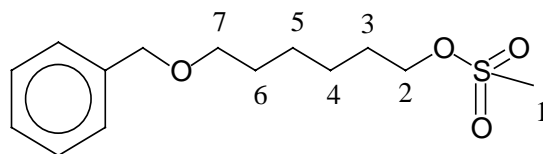
$R_f = 0.76$ (EE)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 7.39 - 7.29 (m, 5, ar.), 4.52 (s, 2, bzl.), 3.61 (m, 2, H-1), 3.53, 3.50, 3.48 (t, 2, H-6, $^3J = 6.1$ Hz), 1.73 - 1.63 (m, 8, H-2, H-3, H-4, H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 138.23 (C-8), 128.46, 127.77, 127.51 (C-9, C-10, C-11), 72.81 (C-1), 70.28 (C-6), 61.94 (C-7), 32.98, 29.99, 26.54, 25.56 (C-2, C-3, C-4, C-5)

MS: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$ ber. 208.30 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 209$ ESI+

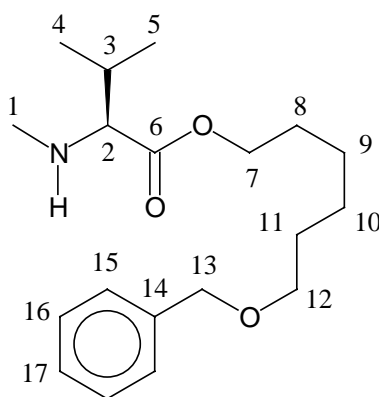
6.1.3.30 Methansulfonsäure-6-benzyloxy-hexylester 22

22

Bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden zu einer Lösung aus 280 μl (3.6 mmol) Mesylchlorid in 10 ml Pyridin 500 mg (2.4 mmol) **21b** in 5 ml Pyridin langsam zugetropft und 24 Stunden unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 50 ml 10%iger Citronensäure versetzt und dreimal mit 60 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt (700 mg) war laut $^1\text{H-NMR}$ sauber, es konnte kein **21b** beobachtet werden.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 7.31 - 7.27 (m, 5, ar.), 4.42 (s, 2, bzL.), 4.16, 4.13, 4.11 (t, 2, H-2, $^3J = 6.5\text{ Hz}$), 3.42, 3.40, 3.37 (t, 2, H-7, $^3J = 6.4\text{ Hz}$), 2.90 (s, 3, H-1), 1.73 - 1.32 (m, 4, H-2 bis H-6)

6.1.3.31 N-Methyl-Valin (6'-benzyloxy)-hexylester 23

23

Zu einer Lösung aus 460 mg (3.2 mmol) N-Methyl-Valinmethylester **19** in 5 ml DMF wurde bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 170 mg (4.2 mmol) NaH (60%ige Dispersion auf Mineralöl) zugegeben

und 30 Minuten gerührt. Das Rohprodukt von **22** in 5 ml DMF wurde zugetropft und 24 Stunden unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 40 ml ges. NaCl-Lösung versetzt und dreimal mit je 30 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (T/EE 9:1) erhielt man eine farblose zähe Flüssigkeit.

Ausbeute: 230 mg (34 % der Theorie)

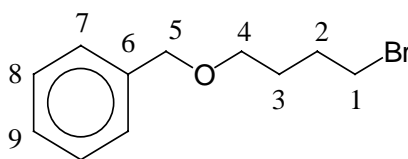
R_f = 0.28 (T/EE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 7.38 – 7.29 (m, 5, ar.), 4.50 (s, 1, bz.), 4.16, 4.13, 4.10 (t, 2, H-7, ³J = 6.7 Hz), 3.49, 3.46, 3.44 (t, 2, H-12, ³J = 6.4 Hz), 2.92, 2.90 (d, 1, H-2, ³J = 6.0 Hz), 2.36 (s, 3, H-1), 1.99 -1.88 (m, 2, H-3, NH), 1.71 – 1.57 (m, 4, H-8, H-11), 1.48 – 1.37 (m, 4, H-9, H-10), 0.97, 0.95, 0.94, 0.93 (d, 4, H-4, H-5)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 173.31 (C-6), 138.60 (C-14), 129.51, 128.33, 127.88 (C-15, C-16, C-17), 72.90 (C-13), 70.22 (C-12), 68.98 (C-2), 64.85 (C-7), 34.87 (C-1), 31.37, 29.61, 28.60, 25.82 (C-9, C-10, C-11, C-12), 19.38, 18.93 (C-4, C-5)

MS: C₁₉H₃₁NO₃ ber. 321.46 gef. (M+H)⁺ = 322 ESI+

6.1.3.32 1-Benzoyloxy-4-brombutan **25a**



25a

Zu einer Lösung von 21.6 g (200 mmol) 1,4-Dibrombutan in 150 ml THF wurden bei 0 °C 4.0 g (100 mmol) NaH (60 %ige Dispersion auf Mineralöl) zugegeben und 5.2 ml (50 mmol) Benzylbromid in 50 ml THF zugetropft. Es wurde unter Sieden drei Stunden erhitzt. Die Lösung wurde in ges. NaCl-Lösung bei 0 °C gegeben und dreimal mit 80 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde fraktioniert im Vakuum destilliert. Die schwach gelbliche Flüssigkeit besitzt einen Siedepunkt von 93 °C bei 10⁻¹ Torr.

Ausbeute: 10.2 g (84 % der Theorie)

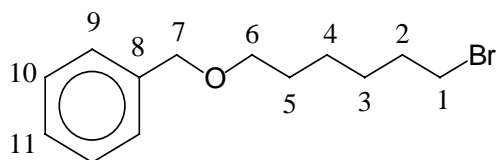
$R_f = 0.87$ (T/EE 4:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 7.38 - 7.28 (m, 5, ar.), 4.50 (s, 2, bz.), 3.50 (m, 4, H-1, H-4), 2.05 - 1.65 (m, 4, H-2, H-3)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 138.26 (C-6), 128.39, 127.45, 127.40 (C-7, C-8, C-9), 72.86 (C-1), 69.68 (C-4), 65.16 (C-5), 33.60, 29.53 (C-2, C-3)

MS: C₁₁H₁₅OBr ber. 243.14 gef. (M+H)⁺ = 244 ESI+

6.1.3.33 1-Benzylloxy-6-bromhexan 25b



25b

Es wurden 30.6 ml (200 mmol) 1,6-Dibromhexan und 5.2 ml (50 mmol) Benzylbromid analog zu 25a eingesetzt. Nach fraktionierter Destillation bei 10⁻¹ Torr erhielt man eine leicht gelbliche Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 110 °C.

Ausbeute: 12.3 g (91 % der Theorie)

Sdp.: 110 °C bei 10⁻¹ mbar

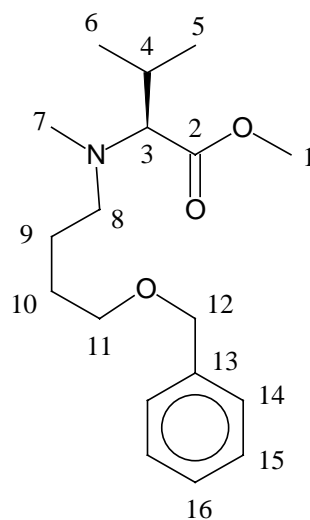
R_f = 0.90 (T/EE 4:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 7.39 - 7.28 (m, 5, ar.), 4.51 (s, 2, bzl.), 3.41 (m, 4, H-1, H-6), 1.93 - 1.43 (m, 8, H-2, H-3, H-4, H-5)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 138.48 (C-8), 128.20, 127.46, 127.35 (C-9, C-10, C-11), 72.75 (C-1), 70.04 (C-6), 61.94 (C-7), 33.76, 29.56, 27.84, 25.27 (C-2, C-3, C-4, C-5)

MS: C₁₃H₁₉OBr ber. 271.19 gef. (M+H)⁺ = 272 ESI+

6.1.3.34 N-(4'-Benzyloxybutyl)-N-Methyl-Valin methylester **26a**



26a

Eine Lösung aus 1.0 g (3.8 mmol) N-Methyl-Valinmethylester **19**, 1.6 g (11.3 mmol) K₂CO₃, 1.1 g (4.5 mmol) **25a** und eine Spatelspitze KI in 20 ml Acetonitril bzw. Acetonitril wurden 10 Tage bei Raumtemperatur gerührt und einen Tag unter Sieden erhitzt. Die Lösung wurde mit 30 ml Wasser versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die wäßrige Lösung wurde dreimal mit je 30 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (T/EE 9:1 bis 1:1) erhielt man eine farblose, hoch viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 260 mg (22 % der Theorie)

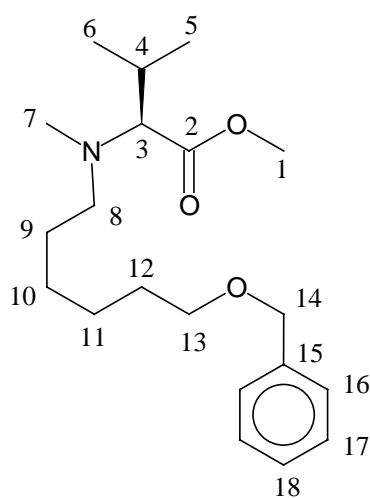
$R_f = 0.50$ (T/EE 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 7.38 – 7.29 (m, 5, ar.), 4.50 (s, 1, bz1.), 3.67 (s, 3, H-1), 3.51, 3.48, 3.46 (t, 2, H-11, $^3J = 6.3$ Hz), 2.79, 2.75 (d, 1, H-3, $^3J = 10.7$ Hz), 2.57 – 2.31 (m, 2, H-8), 2.24 (s, 3, H-7), 2.04 (m, 1, H-4), 1.67 – 1.50 (m, 4, H-9, H-10), 0.98, 0.95, 0.87, 0.84 (d, 6, H-5, H-6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 172.21 (C-2), 138.52 (C-13), 128.86, 128.09, 127.44 (C-14, C-15, C-16), 73.24 (C-12), 72.68 (C-11), 70.14 (C-3), 54.05 (C-8), 50.24 (C-1), 37.19 (C-7), 27.16, 27.14, 24.43 (C-4, C-9, C-10), 19.70, 19.21 (C-5, C-6)

MS: $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ ber. 307.43 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 308$ ESI+

6.1.3.35 N-(5'-Benzyloxyhexyl)-N-Methyl-Valin methylester 26b



26b

Es wurden analog zu **26a** 500 mg (1.9 mmol) N-Methyl-Valinmethylester **19** mit 620 mg (2.2 mmol) **25b** in 5 ml Aceton umgesetzt, 7 Tage unter Sieden erhitzt und 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt.

Ausbeute: 300 mg (51 % der Theorie)

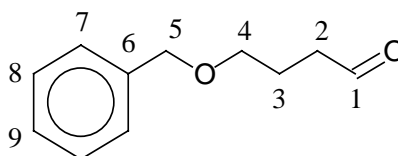
$R_f = 0.22$ (T/EE 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 7.37 (m, 5, ar.), 4.51 (s, 1, bz1.), 3.69 (s, 3, H-1), 3.50, 3.48, 3.46 (t, 2, H-13, $^3J = 7.4$ Hz), 2.81, 2.77 (d, 1, H-3, $^3J = 10.6$ Hz), 2.48 – 2.32 (m, 2, H-8), 2.19 (s, 3, H-7), 1.97 (m, 1, H-4), 1.63 – 1.27 (m, 8, H-9, H-10, H-11, H-12), 0.99, 0.96, 0.88, 0.87 (d, 6, H-5, H-6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 168.21 (C-2), 138.36 (C-15), 128.19, 127.49, 127.37 (C-16, C-17, C-18), 72.75 (C-14), 71.75 (C-13), 69.79 (C-3), 52.38 (C-8), 50.27 (C-1), 29.22 (C-7), 28.14, 26.41, 26.23, 24.07, 23.65 (C-4, C-9, C-10, C-11, C-12), 20.00, 19.08 (C-5, C-6)

MS: $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NO}_3$ ber. 335.48 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 336$ ESI+

6.1.3.36 4-Benzoyloxy-1-butanal **28a**



28a

Zu einer Lösung aus 10.0 g (56 mmol) **21a** und 22 ml (167 mmol) TEA in 50 ml CH_2Cl_2 wurden bei 0 °C 26.5 g (167 mmol) SO_3 *Pyridin-Komplex in 200 ml DMSO innerhalb von einer Stunde zugetropft und zwei Stunden unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf 300 ml ges- NH_4Cl -/Eis-Lösung gegeben und dreimal mit 80 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden

über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (T/EE 9:1) erhielt man eine farblose Flüssigkeit von geringer Viskosität.

Ausbeute: 8.3 g (83 % der Theorie)

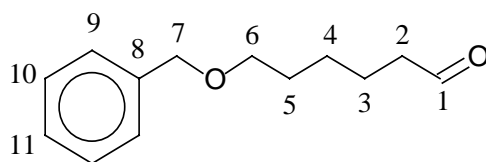
$R_f = 0.74$ (T/EE 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 9.79, 9.78, 9.78 (t, 1, H-1, $^3J = 1.5$ Hz), 7.39 - 7.33 (m, 5, ar.), 4.50 (s, 2, bz1.), 3.54, 3.51, 3.49 (t, 2, H-4, $^3J = 6.1$ Hz), 2.59, 2.58, 2.56, 2.55, 2.53, 2.52 (dt, 2, H-2, $^3J = 1.5$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz), 2.01, 1.98, 1.96, 1.93, 1.90 (p, 2, H-3, $^3J = 6.1$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 202.12 (C-1), 138.10 (C-6), 128.25, 127.47 (C-7, C-8, C-9), 72.80 (C-4), 68.97 (C-5), 40.79 (C-2), 22.40 (C-3)

MS: $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$ ber. 178.23 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 179$ ESI+

6.1.3.37 6-Benzoyloxy-1-hexanal 28b



28b

Es wurden analog zu 28a 4.7 g (22.6 mmol) 21b umgesetzt. Man erhielt eine farblose Flüssigkeit.

Ausbeute: 4.1 g (87 % der Theorie)

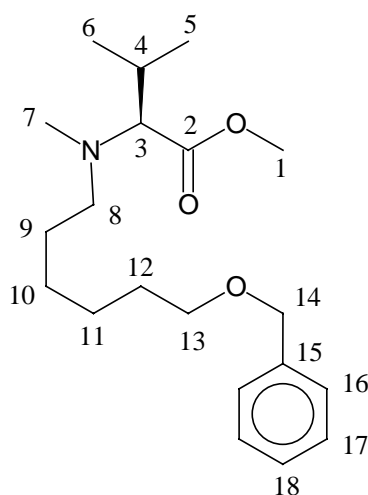
$R_f = 0.74$ (T/EE 9:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 9.76, 9.75, 9.71 (t, 1, H-1, ³J = 3.4 Hz), 7.34 - 7.26 (m, 5, ar.), 4.50 (s, 2, bzL.), 3.49, 3.46, 3.44 (t, 2, H-6, ³J = 6.3 Hz), 2.40 (m, 2, H-2), 1.68 - 1.38 (m, 6, H-3, H-4, H-5)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 202.47 (C-1), 138.52 (C-8), 129.45, 128.29, 127.54 (C-9, C-10, C-11), 72.83 (C-6), 69.95 (C-7), 43.73 (C-2), 29.45, 25.76, 21.819 (C-3, C-4, C-5)

MS: C₁₃H₁₈O₂ ber. 206.28 gef. (M+H)⁺ = 207 ESI+

6.1.3.38 N-(5'-Benzyloxyhexyl)-N-Methyl-Valin methylester **26b**



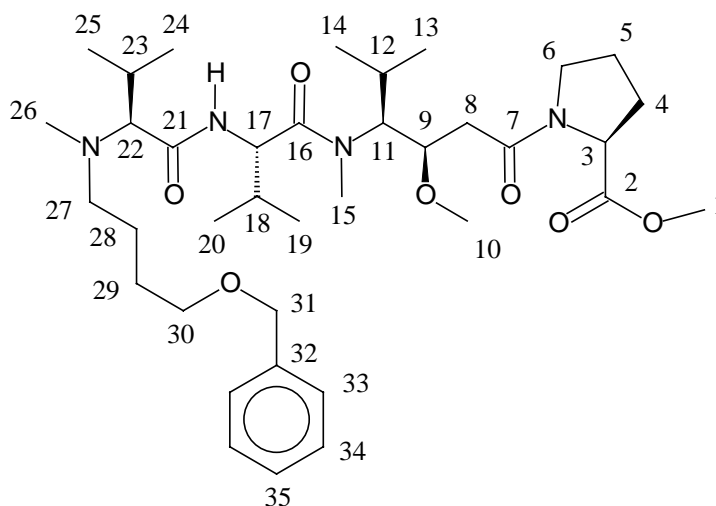
26b

266 mg (1.0 mmol) **19**, 768 mg (4.0 mmol) **28b** und 300 µl (2.0 mmol) TEA in 10 ml Methanol wurden in Gegenwart von 1.6 g Molsieb (4 A) mit TFA auf pH 6 eingestellt und zwei Stunden bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 60 mg NaBH₄ wurde 18 Stunden unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Durch portionsweise Zugabe von insgesamt 400 mg NaBH₄ wurde der Aldehyd vollständig reduziert. Die Lösung wurde über Cellit filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 40 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (H/EE 9:1) erhielt man eine farblose viskose Flüssigkeit.

Ausbeute: 310 mg (96 % der Theorie)

6.1.3.39 N-(4'-Benzyloxyl)-butyl-N-Me-Val-Val-Dav-Pro-OMe **30a**



30a

600 mg (1.2 mmol) **29** und 2.1 g (11.7 mmol) **28a** in 20 ml CH₂Cl₂ wurden eine Stunde bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 221 mg (5.9 mmol) NaBH₄ wurden innerhalb einer Stunde 20 ml TFA langsam zugetropft und 18 Stunden unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt und dreimal mit 30 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie über 100 g Kieselgel (CH₂Cl₂/Methanol 99:1) erhielt man ein dickflüssiges farbloses Öl.

Ausbeute: 260 mg (33 % der Theorie)

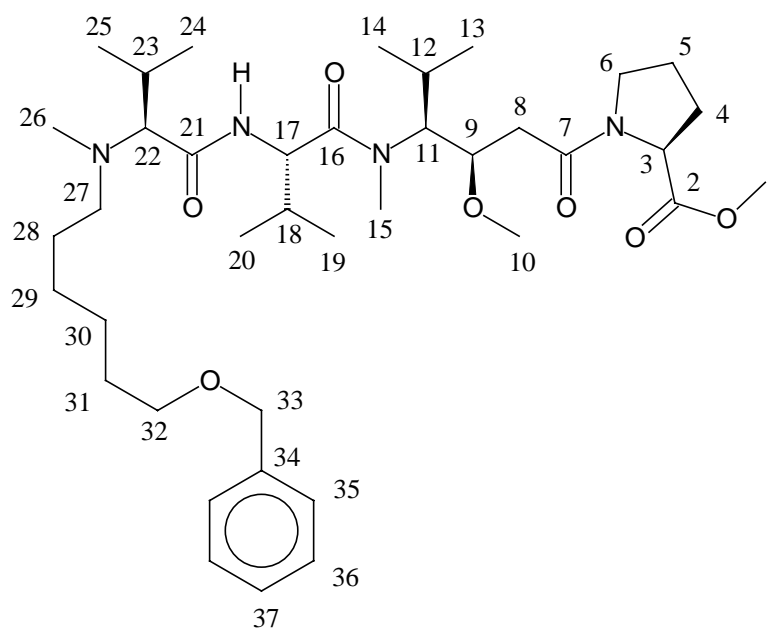
R_f = 0.21 (T/EE 1:2)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 7.37 - 7.29 (m, 6, ar., NH), 4.49 (s, 2, bzl.), 4.69 - 4.43 (m, 2, H-3, H-17), 4.04 - 3.95 (m, 1, H-9), 3.75 - 3.32 (m, 9, H-1, H-6, H-6', H-10, H-11, H-30), 3.01 - 2.72 (m, 9, H-15, H-22, H-26, H-27), 2.52 - 1.62 (m, 13, H-4, H-4', H-5, H-5', H-8, H-8', H-12, H-18, H-23, H-28, H-29), 1.16 - 0.78 (m, 18, H-13, H-14, H-19, H-20, H-24, H-25)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 175.62, 171.33, 169.68 (C-2, C-7, C-16, C-21), 138.21 (C-32), 129.27, 128.00, 127.89 (C-33, C-34, C-35), 78.72 (C-9), 66.01, 62.21, 59.56, 57.99 (C-3, C-10, C-11, C-17, C-22, C-31), 53.89, 50.52, 50.01 (C-1, C-30), 46.10 (C-6), 42.03, 39.59, 33.86, 31.78, 30.76, 29.62, 29.11, 28.23, 26.34, 24.78, 24.46 (C-4, C-5, C-8, C-12, C-15, C-18, C-23, C-26, C-27), 23.87, 19.89, 19.31, 18.67, 17.99 (C-13, C-14, C-19, C-20, C-24, C-25)

MS: C₃₇H₆₂N₄O₇ ber. 674.92 gef. (M+H)⁺ = 676 ESI+

6.1.3.40 N-(6'-Benzyloxy)-hexyl-N-Me-Val-Val-Dav-Pro-OMe **30b**



30b

800 mg (1.6 mmol) **29** und 1.3 g (6.3 mmol) **28b** in 15 ml Methanol wurden eine Stunde bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 100 mg NaBH₄ wurden 18 Stunden unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml Wasser und 30 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und dreimal mit 30 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie über 100 g Kieselgel (CH₂Cl₂/Methanol 99:1) erhielt man ein dickflüssiges farbloses Öl.

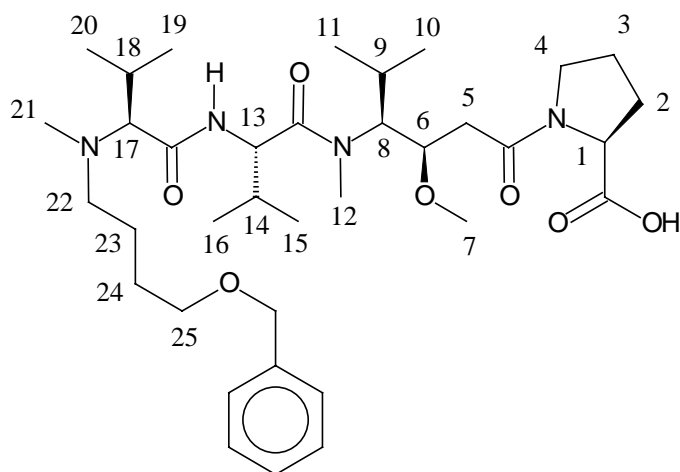
Ausbeute: 520 mg (46 % der Theorie)

R_f = 0.10 (T/EE 2:1)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS); 7.35 - 7.29 (m, 5, ar.), 6.78, 6.68 (br. d, 1, NH, ³J = 8.9 Hz), 4.62 (m, 1, H-17), 4.52 (m, 1, H-9), 4.49 (s, 2, bzI.), 4.43 (m, 1, H-3), 3.98 (m, 1, H-11), 3.71 (m, 4, H-1, H-6), 3.44 (m, 6, H-6', H-10, H-32), 3.12 (s, 6, H-15, H-26), 2.72 (m, 1, H-22), 2.48 - 2.37 (m, 4, H-8, H-8', H-27), 2.32 - 1.94 (m, 7, H-4, H-4', H-5, H-5', H-12, H-18, H-23), 1.67 - 1.31 (m, 8, H-28, H-29, H-30, H-31), 1.18 - 0.72 (m, 18, H-13, H-14, H-19, H-20, H-24, H-25)

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 173.66, 172.76, 170.23, 169.78 (C-2, C-7, C-16, C-21), 137.67 (C-34), 127.01, 126.89, 126.31 (C-35, C-36, C-37), 78.01 (C-9), 65.93, 61.99, 59.22, 58.42 (C-3, C-10, C-11, C-17, C-22), 54.07, 51.82, 51.65 (C-1, C-33, C-32), 47.10 (C-6), 40.74, 34.04, 32.86, 30.98, 30.76, 29.62, 29.11, 28.23, 26.34, 24.78, 24.46 (C-4, C-5, C-8, C-12, C-15, C-18, C-23, C-26, C-27), 23.43, 23.03, 22.87 (C-28, C-29, C-30, C-31), 20.07, 19.55, 19.17, 18.37, 17.61 (C-13, C-14, C-19, C-20, C-24, C-25)

MS: C₃₉H₆₆N₄O₇ ber. 702.97 gef. (M+H)⁺ = 704 ESI+

6.1.3.41 N-(4'-Benzyloxyl)-butyl-N-Me-Val-Val-Dav-Pro 31a**31a**

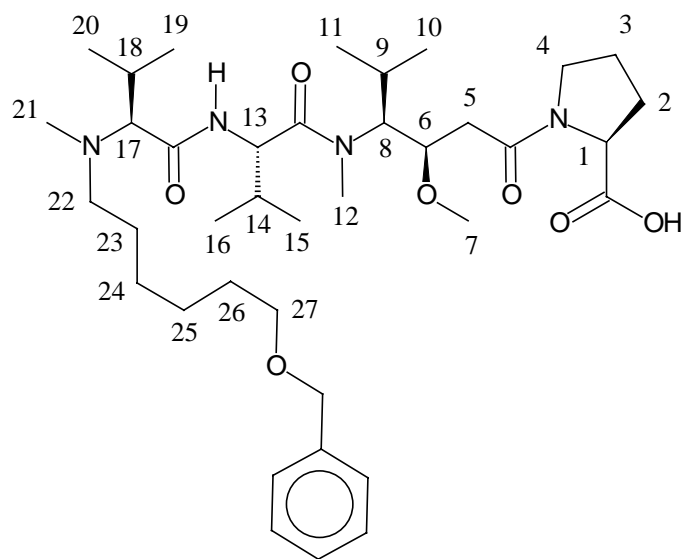
Es wurden gemäß AAV 3 680 mg (1.0 mmol) **30a** entschützt und als Rohprodukt zu **32a** eingesetzt.

R_f = 0.16 (CH₂Cl₂/Methanol 9:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 7.32 - 7.29 (m, 6, ar., NH), 4.48 (s, 2, bz.), 4.72 - 4.43 (m, 2, H-1, H-13), 4.04 - 3.95 (m, 1, H-6), 3.58 - 3.32 (m, 6, H-4, H-4', H-7, H-8, H-25), 3.01 - 2.72 (m, 9, H-12, H-17, H-21, H-22), 2.52 - 1.62 (m, 13, H-2, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5', H-9, H-14, H-18, H-23, H-24), 1.16 - 0.78 (m, 18, H-10, H-11, H-15, H-16, H-19, H-20)

MS: C₃₆H₆₀N₄O₇ ber. 660.89 gef. (M+H)⁺ = 662 ESI+

6.1.3.42 N-(6'-Benzyloxyl)-hexyl-N-Me-Val-Val-Dav-Pro **31b**



31b

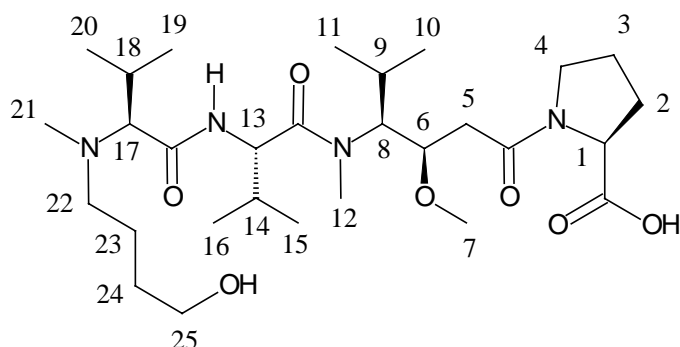
Es wurden gemäß AAV 3 200 mg (0.28 mmol) **30b** entschützt und als Rohprodukt zu **32b** weiter umgesetzt.

Ausbeute: 110 mg (56 % der Theorie)

$R_f = 0.14$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 7.34 - 7.29 (m, 6, ar., NH), 4.47 (s, 2, bzl.), 4.74 - 4.42 (m, 2, H-1, H-13), 4.00 - 3.83 (m, 1, H-6), 3.70 - 3.20 (m, 6, H-4, H-4', H-7, H-8, H-27), 3.01 - 2.80 (m, 9, H-12, H-17, H-21, H-22), 2.58 - 1.48 (m, 15, H-2, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5', H-9, H-14, H-18, H-23, H-24, H-25, H-26), 1.17 - 0.77 (m, 18, H-10, H-11, H-15, H-16, H-19, H-20)

MS: $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_7$ ber. 688.94 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 690$ ESI+

6.1.3.43 N-(4'-Hydroxy)-butyl-N-Me-Val-Val-Dav-Pro 32a**32a**

Es wurden gemäß AAV 1 500 mg des Rohproduktes von **31a** entschützt und anschließend mittels HPLC gereinigt.

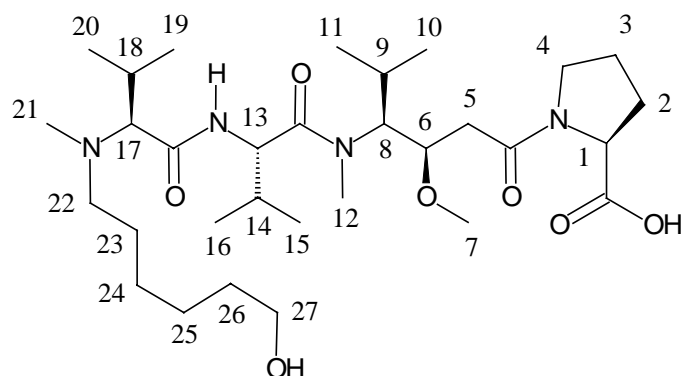
Ausbeute: 120 mg (21 % der Theorie bezogen auf **30a**)

R_t = 19.15 min. (Säule C, Gradient 1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS), als TFA-Salz: 8.27, 8.23 (br.d, 1, NH), 5.45 (m, 1, H-1), 4.58 (m, 1, H-13), 4.34 - 4.07 (m, 4, H-6, H-17, H-25), 3.72 - 3.33 (m, 6, H-4, H-4', H-7, H-8), 3.08 - 2.67 (m, 8, H-12, H-21, H-22), 2.30 - 1.69 (m, 13, H-2, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5', H-9, H-14, H-18, H-23, H-24), 1.11 - 0.79 (m, 18, H-10, H-11, H-15, H-16, H-19, H-20)

MS: $\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_7$ ber. 570.77 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 572$ ESI+

6.1.3.44 N-(6'-Hydroxy)-hexyl-N-Me-Val-Val-Dav-Pro **32b**



32b

110 mg (0.16 mmol) **31b** in 1 ml Eisessig wurden mit 1 ml HBr (5.7 M in Essigsäure) versetzt und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 5 ml Toluol wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels HPLC aufgereinigt.

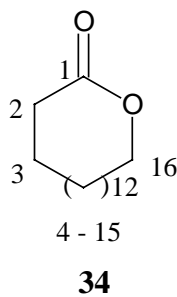
Ausbeute: 40 mg (42 % der Theorie)

$R_f = 0.16$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 9:1)

$R_t = 23.11$ min. (Säule C, Gradient 1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS), als TFA-Salz: 8.34, 8.29 (br. d, 1, NH), 4.74 - 4.42 (m, 2, H-1, H-13), 4.00 - 3.83 (m, 1, H-6), 3.70 - 3.20 (m, 6, H-4, H-4', H-7, H-8, H-27), 3.01 - 2.80 (m, 9, H-12, H-17, H-21, H-22), 2.58 - 1.48 (m, 15, H-2, H-2', H-3, H-3', H-5, H-5', H-9, H-14, H-18, H-23, H-24, H-25, H-26), 1.17 - 0.77 (m, 18, H-10, H-11, H-15, H-16, H-19, H-20)

MS: $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_7$ ber. 598.82 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 599$ ESI+

6.1.3.45 16-Hydroxyhexadecansäurelacton 34

300 mg (1.1 mmol) 16-Hydroxyhexadecansäure in 5 ml CH_2Cl_2 wurden mit 155 μl (1.2 mmol) Triethylamin und 156 μl (1 mmol) 2,4,6-Trichlorbenzoesäurechlorid versetzt und die Bildung des Aktivesters mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach 18 Stunden wurde die Lösung mit 500 ml CH_2Cl_2 verdünnt, 244 mg (2 mmol) Dimethylaminopyridin zugegeben, und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 100 ml ges. NaHCO_3 -Lösung und 100 ml 10%iger Citronensäure gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der weiße Rückstand konnte ohne weitere Aufreinigung analysiert werden.

Ausbeute: 270 mg (96 % der Theorie)

$R_f = 0.60$ (CH_2Cl_2 /Methanol 9:1)

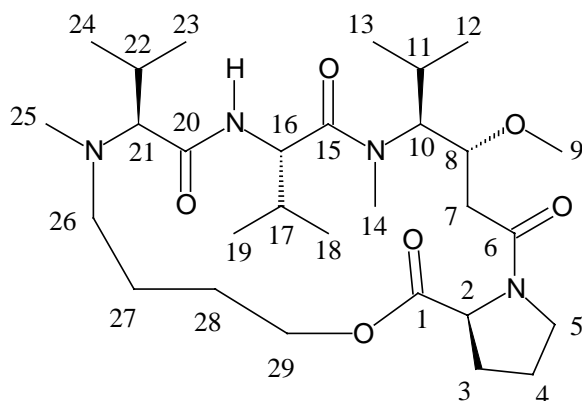
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 3.65, 3.63, 3.62 (t, 2, H-2, $^3J = 6.7$ Hz), 2.35, 2.31, 2.27 (t, 2, H-16, $^3J = 7.5$ Hz), 1.62 – 1.53 (m, 4, H-3, H-15), 1.25 (m, 24, H-4 – H-14)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 174.27 (C-1), 62.82 (C-2), 34.33 (C-16), 32.95 (C-3), 25.12 (C-15), 19.70, 19.21 (C-4 - C-14)

MS: $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$ ber. 254.41 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 255$ ESI+

Smp.: 35 °C

6.1.3.46 cyclo-(4-Hydroxy-butyl-N-Me-Val-Val-Dav-Pro) **35a**



35a

70 mg (0.12 mmol) **32a** in 5 ml CH₂Cl₂ wurden mit 19.0 µl (0.15 mmol) Triethylamin und 19.2 µl (0.12 mmol) 2,4,6-Trichlorbenzoesäurechlorid versetzt und die Bildung des Aktivesters mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach 18 Stunden wurde die Lösung mit 120 ml CH₂Cl₂ verdünnt, 30.0 mg (0.25 mmol) Dimethylaminopyridin zugegeben, und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 100 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der weiße Rückstand wurde mittels HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 10 mg (15 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

R_f = 0.43 (CH₂Cl₂/Methanol 4:1)

R_t = 19.36 min. (Säule A, Gradient 1)

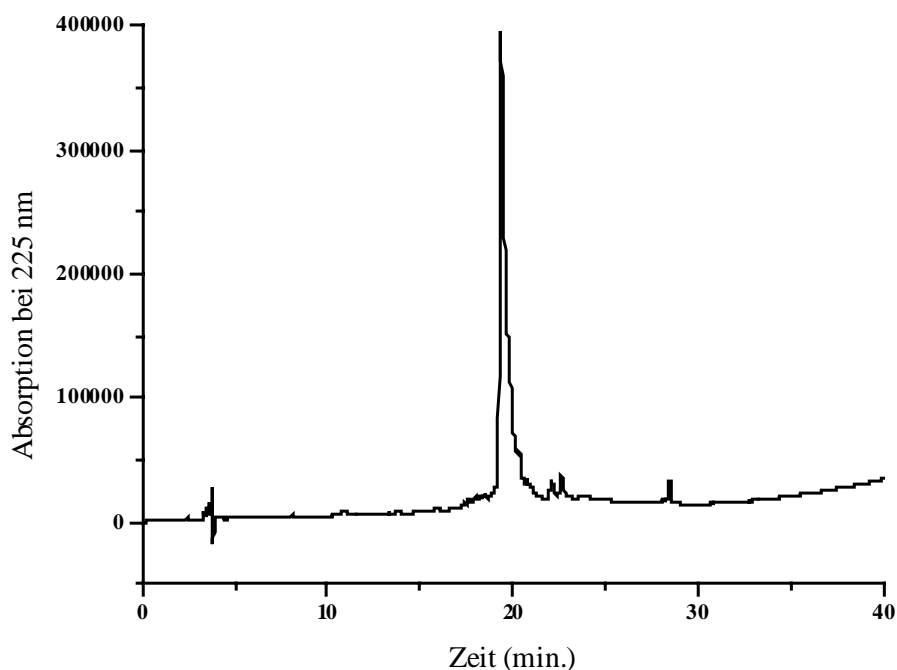


Abb. 6.17: HPLC-Chromatogramm von **35a**

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂, 290 K, TMS): 8.44 (NH), 4.86 (H-16), 4.75 (H-10), 4.37 (H-2), 4.00 (H-21), 3.80 (H-8), 3.66, 3.48 (H-5), 3.47, 3.38 (H-29), 3.29 (H-9), 3.03 (H-14), 3.15, 3.05 (H-14), 2.63 (H-25), 2.62, 2.55 (H-7), 2.34 (H-26), 2.21 (H-22), 2.14 (H-3), 2.06, 1.97 (H-4), 2.03 (H-17), 2.00 (H-11), 1.69, 1.58 (H-27, H-28), 1.00, 0.89 (H-23, H-24), 0.97 (H-18, H-19), 0.95, 0.81 (H-12, H-13)

¹³C-NMR (150.9 MHz, H₂O, 290 K): 175.56 (C-1), 173.79 (C-15), 170.79 (C-6), 166.57 (C-20), 77.02 (C-8), 67.01 (C-21), 58.78 (C-2), 59.49 (C-10), 55.82 (C-9), 55.72 (C-16), 47.16 (C-5), 46.61 (C-31), 35.02 (C-7), 31.67 (C-14), 32.38 (C-25), 30.56 (C-26), 30.19 (C-25), 29.33 (C-17), 29.26 (C-22), 28.66 (C-4), 28.39 (C-3), 26.24 (C-17), 21.65 (C-27), 21.60 (C-30), 20.43 (C-29), 20.21 (C-28), 18.99 (C-13), 18.67 (C-12), 17.21 (C-18, C-19), 16.98 (C-23), 16.46 (C-24)

MS: C₂₉H₅₂N₄O₆ ber. 552.75 gef. (M+H)⁺ = 554 ESI+

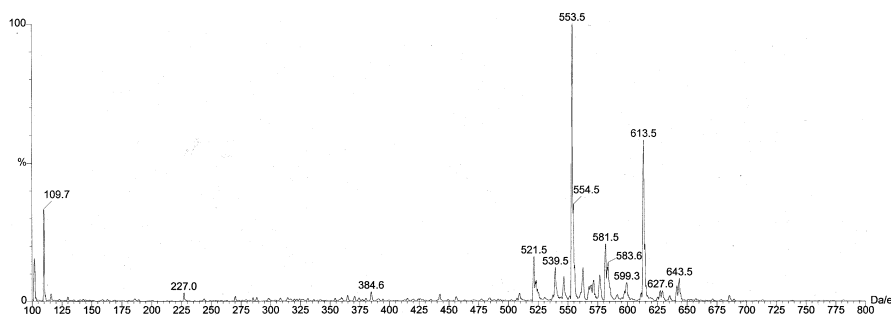
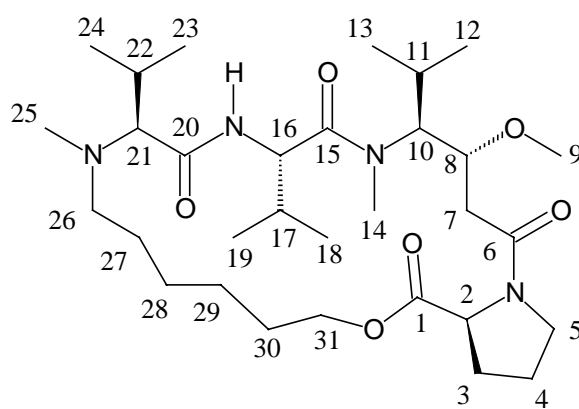


Abb. 6.18: Massenspektrum von **35a**

6.1.3.47 cyclo-(6-Hydroxy-hexyl-N-Me-Val-Val-Dav-Pro) **35b**



35b

Es wurden 30 mg (0.05 mmol) **32b** analog zu **35a** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 10 mg (34 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

$R_f = 0.41$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 4:1)

$R_t = 22.55$ min. (Säule C, Gradient 1)

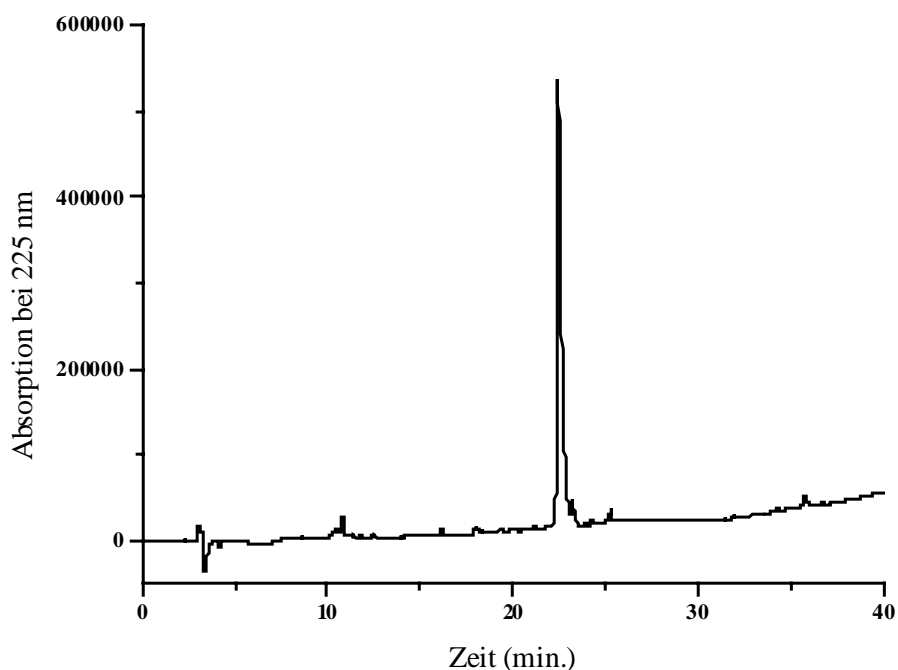


Abb. 6.19: HPLC-Chromatogramm von **35b**

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_2Cl_2 , 290 K, TMS): 7.48 (NH), 4.71 (H-16), 4.54 (H-10), 4.39 (H-2), 3.95 (H-8), 3.74 (H-21), 3.67, 3.43 (H-5), 3.57 (H-31), 3.34 (H-9), 3.25, 3.11 (H-26), 3.01 (H-14), 2.91 (H-25), 2.48, 2.35 (H-7), 2.24 (H-22), 2.15, 1.94 (H-3), 2.06 (H-17), 2.02 (H-4), 1.97 (H-11), 1.78 (H-27), 1.51 (H-30), 1.37 (H-28), 1.36 (H-29), 1.08, 0.91 (H-23, H-24), 1.01, 0.93 (H-18, H-19), 0.97, 0.78 (H-12, H-13)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.9 MHz, CD_2Cl_2 , 290 K, TMS): 175.36 (C-1), 173.42 (C-15), 170.48 (C-6), 166.35 (C-20), 76.93 (C-8), 66.07 (C-21), 58.68 (C-2), 58.45 (C-10), 56.82 (C-9), 55.80 (C-16), 47.06 (C-5), 46.50 (C-29), 35.02 (C-7), 31.47 (C-14), 31.38 (C-25), 30.21 (C-26), 30.19 (C-25), 29.24 (C-17), 29.14 (C-22), 28.41 (C-4), 28.39 (C-3), 25.24 (C-17), 21.64 (C-27), 21.63 (C-28), 18.80 (C-13), 18.26 (C-12), 17.04 (C-18, C-19), 17.04 (C-23), 16.35 (C-24)

MS: $\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_6$ ber. 580.80 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 582$ ESI+

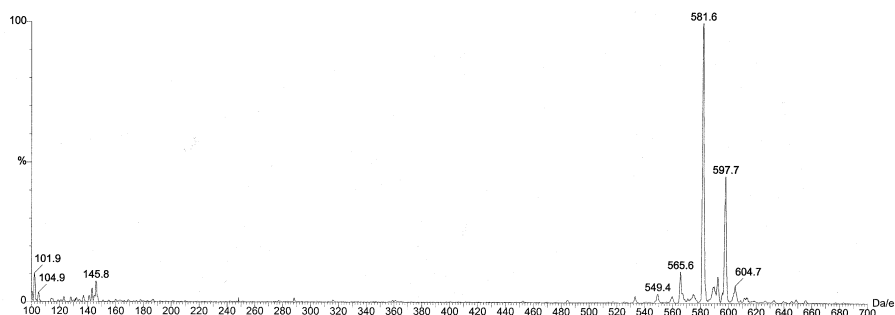
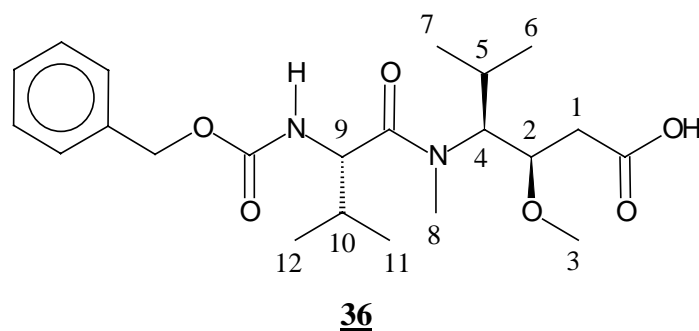


Abb. 6.20: Massenspektrum von 35b

6.1.4 Synthese des linearen Dolastatin 10-Derivates 41

6.1.4.1 Z-Val-Dav-OtBu 36



2.3 g (4.8 mmol) 6 wurden gemäß AAV 2 entschützt.

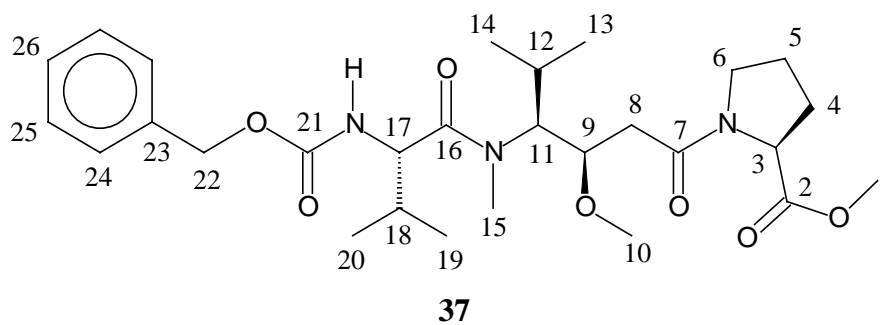
Ausbeute: 1.9 g (93 % der Theorie)

$R_f = 0.35$ (T/EE 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 8.79 (br. s, 1, COOH), 7.34 - 7.29 (m, 5, ar.), 6.05, 6.02 (br. d, NH, $^3J = 9.0$ Hz), 5.08 (s, 2, bzl.), 4.70 - 4.64 (m, 1, H-1), 4.51, 4.48, 4.47, 4.44 (dd, 1, H-9, $^3J = 9.2$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz), 3.89 - 3.87 (m, 1, H-4), 3.33 (s, 3, H-3), 3.01 (s, 3, H-8), 2.56 - 2.39 (m, 2, H-1, H-1'), 2.06 - 1.92 (m, 2, H-5, H-10), 1.15 - 0.82 (m, 6, H-6, H-7, H-11, H-12)

MS: $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6$ ber. 422.52 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 423$ ESI+

6.1.4.2 Z-Val-Dav-Pro-OMe **37**



Es wurden gemäß AAV 4 2.1 g (4.8 mmol) **36**, 863 mg (5.3 mmol) *S*-Prolinmethylester, unter Zugabe von 5.1 g (24 mmol) PPA (50 %ig in Essigester) und 20 ml DIEA in 20 ml CH₂Cl₂ gekuppelt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (T/EE 9:1 bis 100% EE) erhielt man ein zähflüssiges gelbliches Öl.

Ausbeute: 2.7 g (90 % der Theorie)

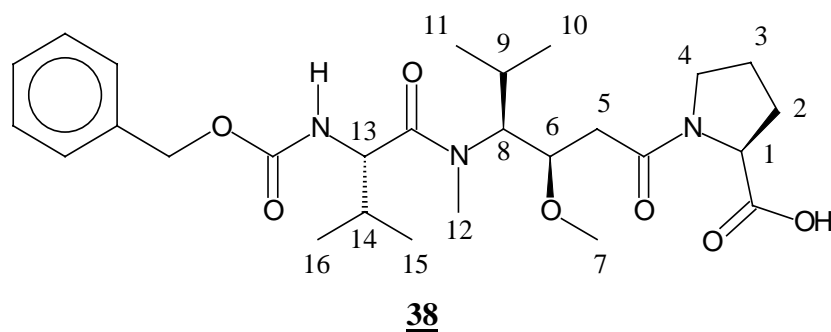
$R_f = 0.13$ (T/EE 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 4:1 vor; 7.31 - 7.27 (m, 5, ar.), 5.60, 5.57 (br. d, 0.2, NH, ³J = 9.2 Hz), 5.51, 5.47 (br. d, 0.8, NH, ³J = 9.3 Hz), 5.07 (s, 2, bzl.), 4.73 - 4.38 (m, 2, H-3, H-17), 4.11 - 4.01 (m, 1, H-9), 3.74 - 3.65 (m, 4, H-1, H-6'), 3.62 - 3.47 (m, 2, H-6, H-11), 3.36 (s, 3, H-10), 2.98 (ψ-s, 3, H-15), 2.54 - 2.46 (m, 2, H-8, H-8'), 2.34 - 1.77 (m, 4, H-4, H-5, H-12, H-18), 1.11 - 0.73 (m, 12, H-13, H-14, H-19, H-20)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 173.10, 172.66, 170.28, 169.76 (C-2, C-21), 156.43, 156.13 (C-7, C-16), 136.46 (C-23), 128.41, 127.96, 127.79 (C-24, C-25, C-26), 78.45 (C-9), 66.71 (C-22), 64.96 (C-11), 59.43 (C-3), 58.76 (C-17), 58.73, 58.37 (C-10), 52.44, 52.06 (C-1), 47.21, 46.46 (C-6), 38.11, 36.97 (C-8, C-15), 31.76, 31.18, 31.07 (C-4, C-5), 30.94, 30.37, 30.17 (C-12, C-18), 20.89, 19.96, 19.55, 17.12, 16.44 (C-13, C-14, C-19, C-20)

MS: $C_{28}H_{43}N_3O_7$ ber. 533.66 gef. $(M+H)^+ = 534$ ESI+

6.1.4.3 Z-Val-Dav-Pro 38



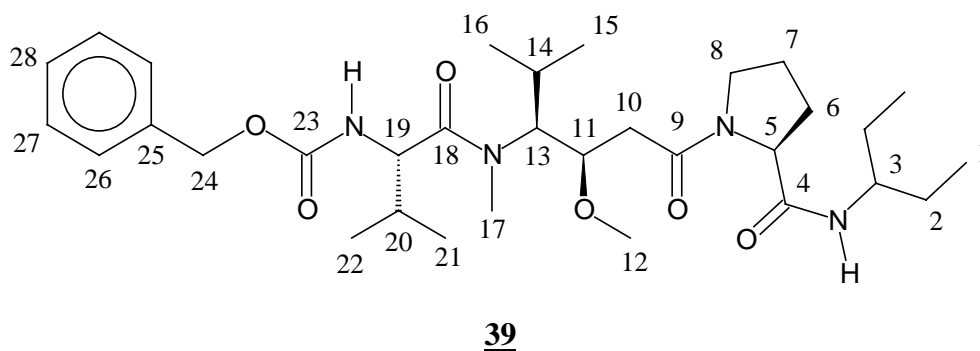
Analog AAV 3 wurden 500 mg (0.94 mmol) 37 entschützt.

Ausbeute: 470 mg (97 % der Theorie)

¹H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): 7.31 - 7.27 (m, 5, ar.), 5.82 - 5.71 (m, 1, NH), 5.07 (s, 2, bz.), 4.73 - 4.38 (m, 2, H-1, H-6), 4.11 - 4.01 (m, 1, H-13), 3.74 - 3.65 (m, 1, H-8), 3.62 - 3.47 (m, 2, H-4, H-4'), 3.36 (s, 3, H-7), 2.98 (ψ-s, 3, H-12), 2.54 - 2.46 (m, 2, H-5, H-5'), 2.34 - 1.77 (m, 6, H-2, H-2', H-3, H-3', H-9, H-14), 1.11 - 0.73 (m, 12, H-10, H-11, H-15, H-16)

MS: $C_{27}H_{41}N_3O_7$ ber. 519.63 gef. $(M+H)^+ = 521$ ESI+

6.1.4.4 Z-Val-Dav-Pro-IPA 39



Es wurden gemäß AAV 4 400 mg (0.8 mmol) 38, 139 mg (1.6 mmol) Isopentylamin, unter Zugabe von 820 mg (3.8 mmol) PPA (50 %ig in Essigester) und 3 ml DIEA in

5 ml CH_2Cl_2 gekuppelt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 95:5) erhielt man ein zähflüssiges gelbliches Öl.

Ausbeute: 530 mg (70 % der Theorie)

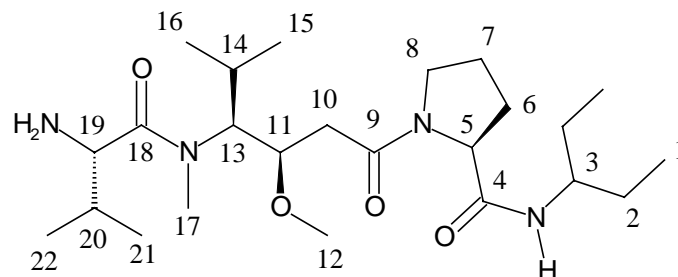
$R_f = 0.83$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 3:1 vor; 7.31 - 7.26 (m, 5, ar.), 6.72, 6.68 (br. d, 1, NH, $^3J = 8.8$ Hz), 5.62, 5.58 (br. d, 0.25, NH, $^3J = 9.1$ Hz), 5.51, 5.48 (br. d, 0.75, NH, $^3J = 8.7$ Hz), 5.08 (s, 2, bzl.), 4.58 - 4.49 (m, 3, H-5, H-11, H-19), 4.14 - 4.06 (m, 2, H-8, H-8'), 3.68 - 3.59 (m, 2, H-3, H-13), 3.31 (s, 3, H-12), 3.00 (ψ -s, 3, H-17), 2.53 - 2.34 (m, 4, H-7, H-7', H-10, H-10'), 2.04 - 1.78 (m, 4, H-6, H-6', H-14, H-20), 1.51 - 1.21 (m, 4, H-2), 1.13 - 0.79 (m, 18, H-1, H-1', H-15, H-16, H-21, H-22)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 171.16, 170.43 (C-23), 158.67, 156.78 (C-4, C-9, C-18), 136.27 (C-25), 128.31, 127.87, 127.66 (C-26, C-27, C-28), 78.45 (C-8), 66.62 (C-24), 59.96 (C-11), 57.90 (C-5), 55.93 (C-19), 51.86 (C-13), 47.75 (C-3), 47.52 (C-12), 37.45 (C-10), 30.91, 27.36, 27.20, 25.37, 24.66 (C-2, C-6, C-7, C-10, C-14, C-20) 19.90, 19.42, 17.04, 14.01, 10.02 (C-1, C-1', C-15, C-16, C-21, C-22)

MS: $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_6$ ber. 588.78 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 590$ ESI+

6.1.4.5 Val-Dav-Pro-IPA 40

**40**

Analog zur AAV 1 wurden 530 mg (0.9 mmol) 39 entschützt.

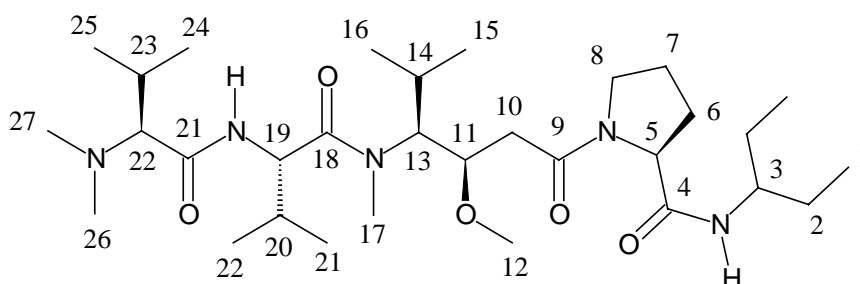
Ausbeute: 200 mg (50 % der Theorie) weißer amorpher Feststoff

$R_f = 0.10$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 3:1 vor; 6.74, 6.70 (br. d, 0.25, NH, $^3J = 7.9$ Hz), 6.68, 6.64 (br. d, 0.75, NH, $^3J = 9.0$ Hz), 4.61 - 4.58 (m, 3, H-5, H-11, H-19), 4.09 - 4.02 (m, 2, H-8, H-8'), 3.73 - 3.52 (m, 2, H-3, H-13), 3.36 (s, 3, H-12), 2.98 (ψ -s, 3, H-17), 2.61 - 1.82 (m, 8, H-6, H-6', H-7, H-7', H-10, H-10', H-14, H-20), 1.55 - 1.25 (m, 4, H-2), 1.22 - 0.82 (m, 18, H-1, H-1', H-15, H-16, H-21, H-22)

MS: $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_4$ ber. 454.65 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 455$ ESI+

6.1.4.6 DMV-Val-Dav-Pro-IPA 41

**41**

Es wurden gemäß AAV 4 200 mg (0.44 mmol) **40**, 127 mg (0.88 mmol) N,N-Dimethylvalin, unter Zugabe von 466 mg (2.2 mmol) PPA (50 %ig in Essigester) und 0.75 ml DIEA in 5 ml CH₂Cl₂ gekuppelt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂/Methanol 95:5 bis 9:1) und anschließender präparativer HPLC-Reinigung erhielt man einen weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 120 mg (55 % der Theorie)

$R_f = 0.45$ (CH₂Cl₂/Methanol 9:1)

$R_t = 23.76$ min. (Säule B, Gradient 1)

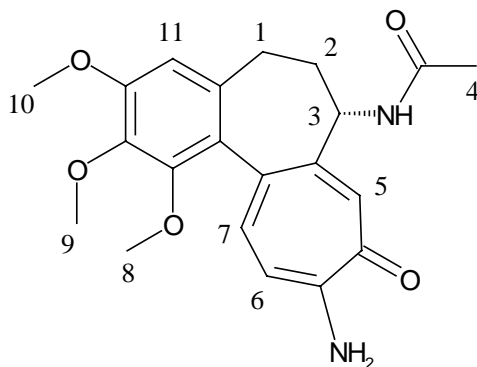
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): die Verbindung liegt in Form zweier Konformere im Verhältnis 4:1 vor, TFA-Salz; 7.42, 7.39 (br. d, 1, NH, ³J = 8.2 Hz), 6.70, 6.67 (br. d, 0.80, NH, ³J = 9.0 Hz), 4.75 - 4.52 (m, 3, H-5, H-19, H-22), 4.18 - 4.06 (m, 1, H-11), 3.77 - 3.59 (m, 3, H-3, H-8, H-8'), 3.39 - 3.36 (m, 1, H-13), 3.32 (s, 3, H-12), 3.03, 2.94 (ψ-s, 9, H-17, H-26, H-27), 2.50 - 1.83 (m, 9, H-6, H-6', H-7, H-7', H-10, H-10', H-14, H-20, H-23), 1.58 - 1.28 (m, 4, H-2, H-2'), 1.11 - 0.76 (m, 24, H-1, H-1', H-15, H-16, H-21, H-22, H-24, H-25)

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 174.51, 174.34, 172.19, 168.10 (C-4, C-9, C-18, C-21), 78.31, 77.48 (C-11), 72.80 (C-3), 60.97 (C-13), 57.83 (C-22), 57.50 (C-5), 55.72 (C-19), 53.52, 53.19 (C-8), 47.97, 47.54 (C-12), 41.29 (C-17), 36.02, 35.75 (C-26, C-27), 32.20 (C-10), 29.99 (C-7), 27.00 (C-6), 25.89, 24.11, 22.39 (C-2, C-2', C-10, C-14, C-20, C-23), 19.63, 18.95, 18.66, 18.08, 17.82, 16.27, 9.80 (C-1, C-1', C-15, C-16, C-21, C-22, C-24, C-25)

MS: C₃₁H₅₉N₅O₅ ber. 581.83 gef. (M+H)⁺ = 583 ESI+

6.1.5 Synthese von ^{13}C -markiertem Colchicin

6.1.5.1 Colchiceinamid 43



43

100 mg (0.25 mmol) Colchicin in 1 ml Methanol wurden mit 3 ml konz. Ammoniaklösung versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels HPLC aufgereinigt.

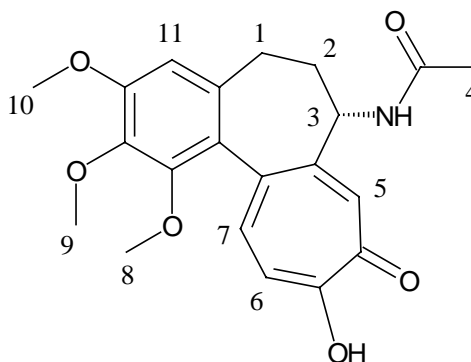
Ausbeute: 106 mg (85 % der Theorie) gelber Feststoff

$R_f = 0.88$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 9:1)

$R_t = 21.57$ min. (Säule A, Gradient 1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 8.04 (br. s, 1, NH), 7.57, 7.52 (d, 1, H-6, $^3J = 11.3$ Hz), 7.14 (m, 2, H-5, H-7), 6.56 (s, 1, H-11), 4.71 (m, 1, H-3), 3.93, 3.91, 3.67 (s, 9, H-8, H-9, H-10), 2.51 – 2.31 (m, 3, H-1, H-2), 2.01 (s, 4, H-2', H-4)

MS: $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ ber. 384.43 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 385$ ESI+

6.1.5.2 Colchicein 44**44**

100 mg (0.25 mmol) Colchicin in 5 ml Aceton wurden mit 52 mg (0.38 mmol) K_2CO_3 in 5 ml Wasser versetzt und zwei Stunden unter Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 85 mg (88 % der Theorie) gelber Feststoff

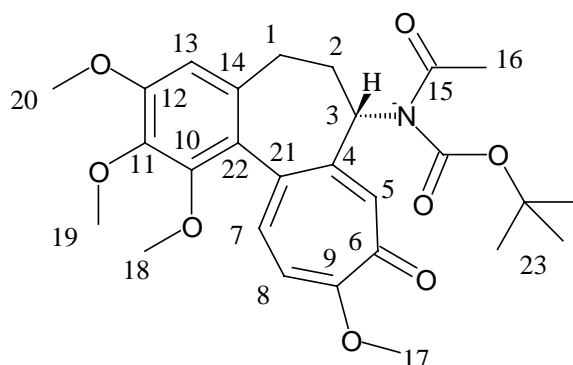
$R_f = 0.31$ (CH_2Cl_2 /Methanol 9:1)

$R_t = 23.61$ min. (Säule A, Gradient 1)

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): 7.69 (s, 1, H-5), 7.67, 7.63 (d, 1, H-6, $^3J = 11.6$ Hz), 7.42, 7.37 (d, 1, H-7, $^3J = 11.6$ Hz), 6.56 (s, 1, H-11), 6.46, 6.44 (br. d, 1, NH, $^3J = 6.3$ Hz), 4.72 (m, 1, H-3), 3.95, 3.91, 3.62 (s, 9, H-8, H-9, H-10), 2.55 – 2.30 (m, 3, H-1, H-2), 2.06 (s, 3, H-4), 1.96 – 1.92 (m, 1, H-2')

MS: $C_{21}H_{23}NO_6$ ber. 385.41 gef. $(M+H)^+ = 386$ ESI+

6.1.5.3 N-[(tert-Butoxy)carbonyl]colchicin **45**

**45**

308 mg (1.4 mmol) Di(tert-butyl)pyrocarbonat wurde portionsweise zu einer Mischung aus 100 mg (0.25 mmol) Colchicin, 50 μ l (0.28 mmol) DIEA und 34 mg (0.28 mmol) DMAP in 5 ml CH_2Cl_2 gegeben und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie über 200 g Kieselgel (CH_2Cl_2 /Methanol 99:1) gereinigt; man erhielt einen gelben Feststoff.

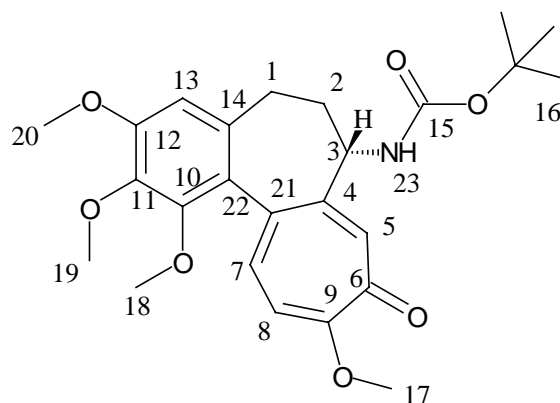
Ausbeute: 50 mg (40 % der Theorie) gelber Feststoff

$R_f = 0.53$ (CH_2Cl_2 /Methanol 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 7.55 (s, 1, H-5), 7.18 (d, 1, H-7, $^3J = 10.7$ Hz), 6.75 (d, 1, H-8, $^3J = 10.8$ Hz), 6.52 (s, 1, H-13), 5.13 (dd, 1, H-3, $^3J = 6.0$ Hz, $^3J = 12.2$ Hz), 3.95 (s, 3, H-17), 3.92 (s, 3, H-20), 3.88 (s, 3, H-18), 3.64 (s, 3, H-19), 2.72 – 2.40 (m, 3, H-1, H-2), 2.26 (s, 3, H-16), 2.06 – 1.87 (m, 1, H-2'), 1.54 (s, 9, H-23)

MS: $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NO}_8$ ber. 499.56 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 500$ ESI+

6.1.5.4 N-[(tert-Butoxy)carbonyl]deacetylcolchicin **46**

**46**

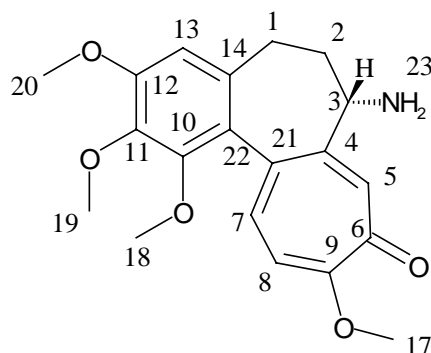
50 mg (0.1 mmol) **45** und 21.6 mg (0.4 mmol) Natriummethanolat in 5 ml Methanol wurden 30 Minuten bei 0 °C und anschließend unter Erwärmen auf Raumtemperatur 24 Stunden gerührt. Die Lösung wurde mit festem NH₄Cl neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 20 ml Wasser und 20 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und dreimal mit 20 ml CH₂Cl₂ extrahiert, die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Als Rohprodukt erhielt man einen schwach gelben Niederschlag.

Rohausbeute: 50 mg

$R_f = 0.53$ (CH₂Cl₂/Methanol 9:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 7.49 (s, 1, H-5), 7.25 (d, 1, H-7, ³J = 10.7 Hz), 6.80 (d, 1, H-8, ³J = 10.8 Hz), 6.52 (s, 1, H-13), 4.96 (br.-d, 1, H-23, ³J = 7.8 Hz), 4.45 – 4.35 (m, 1, H-3), 3.99 (s, 3, H-17), 3.93 (s, 3, H-20), 3.90 (s, 3, H-18), 3.65 (s, 3, H-19), 2.52 – 2.22 (m, 4, H-1, H-2), 1.25 (s, 9, H-16)

6.1.5.5 Deacetylcolchicin 47



47

40 mg (0.09 mmol) **46** wurden 24 Stunden in 1 ml CH_2Cl_2 mit 100 μl TFA gerührt, bis die Gasentwicklung beendet war. Anschliessend wurde mit 20 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung mittels Flashchromatographie (CH_2Cl_2 /Methanol 9:1) erhielt man einen gelben Feststoff.

Ausbeute: 20 mg (64 % der Theorie bezogen auf **45**)

$R_f = 0.29$ (CH_2Cl_2 /Methanol 9:1)

$R_t = 19.48$ min. (Säule A, Gradient 1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): 7.74 (s, 1, H-5), 7.19 (d, 1, H-7, $^3J = 10.7$ Hz), 6.79 (d, 1, H-8, $^3J = 10.8$ Hz), 6.53 (s, 1, H-13), 3.99 (s, 3, H-17), 3.91 (s, 6, H-20, H-18), 3.75 – 3.62 (m, 1, H-3), 3.65 (s, 3, H-17), 2.50 – 2.26 (m, 4, H-1, H-2), 1.65 (br.-s, 2, NH_2)

MS: $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ ber. 357.40 gef. $(\text{M}+\text{H})^+ = 358+$

48

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): 179.10 (C-6), 170.53, 169.72 (d, C-15, ¹J_{CC} = 50.9 Hz), 163.90 (C-9), 153.53 (C-10), 152.55 (C-4), 151.16 (C-12),

141.64 (C-11), 136.95 (C-21), 135.38 (C-7), 134.23 (C-14), 130.22 (C-5), 125.59 (C-22), 112.65 (C-8), 106.99 (C-13), 61.10 (C-20), 61.34 (C-18), 56.09 (C-17), 55.78 (C-19), 52.43 (C-3), 36.15 (C-2), 29.58 (C-1), 22.99, 22.18 (d, C-16, $^1J_{CC} = 50.9$ Hz)

MS: $^{12}C_{20}^{13}C_2H_{25}NO_6$ ber. 401.50 gef. $(M+H)^+ = 402$ ESI+

6.2 Isolierung von Tubulin aus Schweinehirn

Die Isolierung von Tubulin aus Schweinehirn wurde nach einer modifizierten Anleitung von Williams und Lee [67] durchgeführt.

Die Schweinehirne wurden ungefähr ein bis zwei Stunden nach der Schlachtung auf Eis gelagert und bei 4 °C grob von Hirnstamm und oberflächlichen Blutgefäßen befreit, allerdings ohne die Hirnhaut zu entfernen und ausgewogen. Pro Gramm Hirn wurden 1 ml kalter Mes-Puffer, bestehend aus 100 mM Mes, 1 mM EGTA und 1 mM $MgCl_2$, pH 6.9, und 0.5 mg GTP (Dinatriumsalz) zugegeben und im vorgekühlten Waring-Blender 50 Sekunden auf Stufe 1 und 10 Sekunden auf Stufe 2 homogenisiert. Die Lösung wurde auf vorgekühlte GS3-Zentrifugenflaschen (500 ml) verteilt und paarweise auf ein Gramm genau tariert. Anschließend wurde 90 Minuten bei 4 °C und 9000 rpm in der Sorvall-Zentrifuge mit GS3-Rotor zentrifugiert, um die festen Hirnbestandteile von der Tubulin-haltigen Lösung abzutrennen.

Der rötliche Überstand wurde bei 4 °C in einem Meßzylinder über feuchte Gaze dekantiert und das Volumen der Lösung (V_1) bestimmt. Daraus ergaben sich die Mengen für die Zugabe von GTP und Glycerin. Für die erste Polymerisation wurden pro ml Überstand 0.54 ml kalte Glycerin (V_2) und pro ml Gesamtvolumen ($V_1 + V_2$) 0.873 mg GTP benötigt. Zuerst wurde das GTP zugegeben und gewartet, bis es sich aufgelöst hatte und anschließend erfolgte die Zugabe des Glycerins. Es wurde 30 Minuten bei 4 °C im

Becherglas gerührt und der pH-Wert auf 6.9 eingestellt. Die Lösung wurde auf F28/36-Zentrifugenröhrchen mit einer Toleranz von 10 mg gleichmäßig verteilt und im Wasserbad bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Die anschließende 90-minütige Zentrifugation bei 28000 rpm bei 25 °C wurde in der Sorvall-Zentrifuge mit F28/36-Rotor durchgeführt.

Für die Depolymerisation wurde der leicht rötliche Überstand vorsichtig bei 4 °C dekantiert und verworfen. Die Zentrifugenröhrchen wurden kopfüber auf Eis gesteckt und die restliche Flüssigkeit vorsichtig von der Wand der Zentrifugenröhrchen entfernt, um Glycerin, welches bei der Depolymerisation stört, möglichst vollständig zu entfernen. Die schwach rosafarbenen Pellets wurden in kaltem 10 bis 20 ml Mes-Puffer, welcher mit 1 mg GTP pro ml versetzt wurde, resuspendiert und in einem 60 ml Potter homogenisiert. Die Lösung wurde nach 30 Minuten bei 4 °C in zwei F28/36-Zentrifugenröhrchen auf 10 mg genau verteilt und die restlichen mit Wasser gefüllt. Anschließend wurde 60 Minuten bei 4 °C in der Sorvall-Zentrifuge mit F28/36-Rotor mit 28000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50 ml-Greiner-Cap dekantiert und entweder zu Polymerisationsstudien direkt eingesetzt oder für NMR-spektroskopische Untersuchungen mithilfe einer DEAE-Sephadex A50-Säule sofort aufgereinigt.

Für die Präparation des *twice cycled* Tubulin wurden die Schritte beginnend mit der Polymerisation unter den oben beschriebenen Bedingungen wiederholt. Das für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen verwendete MAP-Tubulin wurde nochmals einem Polymerisations-/Depolymerisationsschritt unterzogen, wobei für die Polymerisation des Tubulins auf das Glycerin verzichtet wurde.

6.2.1 SDS-Polyacrylamidgele

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach Lämmli [135] durchgeführt. Die Minigele (70 mm x 80 mm, 1,5 mm dick) wurden folgendermaßen hergestellt:

Tabelle 6.1: Zusammensetzung der 9 %-SDS-Polyacrylamidgele

Lösungen	Trenngel 9 %, pH 8.8	Sammelgel 5 %, pH 6.8
30 % Acrylamid 0.8 % Bisacrylamid	3.0 ml	1.0 ml
Trenngel-Puffer, pH 8.8 1.5 M Tris-HCl, 8 mM EDTA, 0.4 % SDS	2.5 ml	
Sammelgel-Puffer, pH 6.8 0.5 M Tris-HCl, 8 mM EDTA, 0.4 % SDS		2.0 ml
H ₂ O	4.5 ml	5.0 ml
10 % Ammoniumperoxo- disulfat	60 µl	200 µl
N,N,N',N'-Tetramethylen- diamin	6 µl	20 µl

Als Elektrodenpuffer wurde eine Lösung bestehend aus 6.0 g Tris-HCl, pH 8.3, 28.8 g Glycin, 1.0 g SDS und 675 mg EDTA pro Liter verwendet. Von den Protein-Proben wurden 1 bis 5 µl auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt und mit 10 µl Probenpuffer bestehend aus 325 mg Tris-HCl, pH 6.8, 5.5 ml Glycerin, 1.0 g SDS, 30 mg DDT und 1 mg Bromphenolblau in 15 ml H₂O versetzt. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 90 °C wurden die Proben zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Stromstärke betrug für das Sammelgel 20 bis 30 mA und für das Trenngel 40 bis 60 mA. Die Gele wurden 30 Minuten in 0.25 %iger Coomasie Blue G250-Lösung in 50 % Methanol, 7.5 % Essigsäure und 42.25 % Wasser angefärbt und über Nacht in 20 % Methanol, 7.5 % Essigsäure und 72.5 % Wasser entfärbt.

6.2.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt [68], indem 2 bis 5 µl der Protein-Lösung, auf insgesamt 20 µl mit H₂O aufgefüllt, mit 1000 µl Coomassie

Brilliant Blue G-250-Lösung, bestehend aus 0.01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.7 % Ethanol und 8.5 % Phosphorsäure, und 50 µl 1 molarer Natronlauge versetzt wurden. Nach fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm und 463 nm bestimmt und die Gesamtproteinkonzentration anhand der Kalibrierungskurve mit BSA berechnet.

6.2.3 DEAE-Sephadex A50-Säule

Das Tubulin wurde auf der Stufe des *mono-cycled* Tubulin mithilfe einer Anionenaustauschersäule unter Verwendung von DEAE-Sephadex A50 als Säulmaterial aufgereinigt [70]. Der verwendete Puffer bestand aus 100 mM Pipes (pH 6.9), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ und 0.1 mM GTP, welches kurz vor Verwendung des Puffers zugegeben wurde. Das Säulmaterial (ca. 65 ml) in einer 2.75 cm breiten und 18 cm hohen Säule wurde vor der Trennung mit 200 ml Puffer mit 25 mM NaCl mit einer Flußrate von 0.5 ml/min. äquilibriert. Die Protein-Lösung wurde vor dem Auftragen auf die Säule mit 250 mM NaCl versetzt. Für die Eluation des Tubulin wurde ein linearer NaCl-Salzgradient verwendet, welcher aus 100 ml 25 mM bis 250 mM NaCl, 100 ml 250 mM bis 500 mM NaCl und 150 ml 500 mM bis 1 M NaCl in dem beschriebenen Puffersystem mit einer Flußrate von 0.5 ml/min. bestand. Anschließend wurde die Säule mit 150 ml 1 M NaCl gespült. Die Tubulin-Fractionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mithilfe der Amicon-Zelle [71] entsalzt, aufkonzentriert und auf den gewünschten Puffer umgestellt.

6.3 Polymerisationsstudien von Tubulin in Gegenwart von Inhibitoren

Die Polymerisationsstudien von Tubulin in Gegenwart von Dolastatin 10-Derivaten und Colchicin wurden an dem Photometer Lambda 16 von Perkin Elmer bei einer Wellenlänge von 355 nm bei 25 °C durchgeführt. 800 µl der *mono-cycled* Tubulin-Lösung

wurden bei 4 °C mit der zu untersuchenden Verbindung, welche in 40 µl DMSO gelöst war, in der gewünschten Konzentration gemischt und fünf bis zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Vor der Messung wurde die Lösung mit 8 µl einer 100 mM GTP-Lösung versetzt und in eine reduzierte Einmalküvette überführt. Nach dem Einsetzen der Küvette wurde ein Nullabgleich durchgeführt. Es wurde die optische Dichte in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Als Vergleich diente eine unter gleichen Bedingungen hergestellte Tubulin-Lösung ohne Inhibitor.

7 Präparation, Aufnahme- und Prozessierungs-Parameter der untersuchten Proben

7.1 Zyklische Dolastatin 10-Derivate

Für die NMR-spektroskopische Untersuchung der zyklischen Dolastatin 10-Derivate wurden 5 bis 10 mg in dem entsprechenden Lösungsmittel gelöst und in ein 5 mm NMR-Röhrchen überführt.

Die folgenden Tabellen fassen die für die Datenacquisition und –prozessierung verwendeten Parameter der NMR-Experimente an den zyklischen Peptiden **16a,b,c** und **35a,b** zusammen und geben die ^1H -chemischen Verschiebungen der zyklischen Peptide in den verschiedenen Lösungsmitteln an.

7.1.1 NMR-Spektroskopie und Zuordnung von **16a**

Tabelle 7.1: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für **16a** in CDCl_3 . Alle Spektren wurden bei 300 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B_0 [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ_m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	400.14	512 2048	4801.6 4807.7	-	64	1024 4096
TOCSY	400.14	512 2048	4801.6 4807.7	70	64	1024 4096
HSQC	150.90 600.13	512 4096	27155.5 6009.6	-	32	512 4096

Tabelle 7.2: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für **16a** in $\text{DMSO}-d_6$. Alle Spektren wurden bei 300 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B_0 [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ_m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
TOCSY	400.14	512 2048	4801.6 4807.7	70	64	1024 4096

Tabelle 7.3: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für **16a** in CD_3OH . Alle Spektren wurden bei 300 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B_0 [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ_m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	599.87	512 4096	7198.8 7183.9	-	16	1024 8192
TOCSY	599.87	512 4096	7198.8 7183.9	70	16	1024 4096
ROESY	599.87	512 4096	7198.8 7183.9	100	32	512 4096
ROESY	599.87	512 4096	7198.8 7183.9	200	32	512 4096
ROESY	599.87	512 4096	7198.8 7183.9	300	32	512 8192

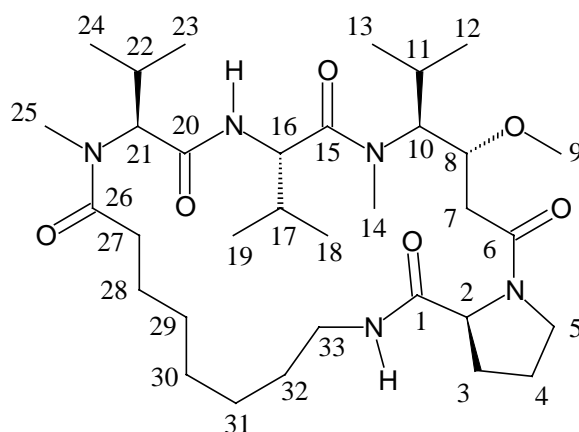


Abb. 7.1: Strukturformel von **16a**

Die Verbindung **16a** liegt in $CDCl_3$ in fünf, in DMSO in vier und in CD_3OH in sieben Konformeren vor. Die Zuordnung der 1H -chemischen Verschiebung von **16a** in den drei Lösungsmitteln ist in Tabelle 7.4,

Tabelle 7.5 und Tabelle 7.6 angegeben. Die sequentielle Zuordnung der einzelnen Spinsysteme in einem Konformer war wegen der starken Überlagerung im ROESY-Spektrum nicht möglich.

Tabelle 7.4: ^1H -chemische Verschiebung von **16a** in CDCl_3 bei 300 K

Rest	Proton	Nr.	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
Dov	H_α	21	3.85				
	H_β	22	2.41				
	H_{γ^*}	23	1.01				
		24	0.85				
	Me^{N}	25	2.86				
Val	H_{N}		8.10	7.20	6.64	6.48	6.35
	H_α	16	4.85	4.46	5.13	4.87	4.87
	H_β	17	2.09	2.05	2.13	2.09	2.08
	H_{γ^*}	18	1.06	1.03	1.09	1.08	1.04
		19	0.91	0.88	0.90	0.90	0.90
Dav	H_α	10	3.99	3.98			
	H_β	11	2.18	2.18			
	H_{γ^*}	12	1.06	1.06			
		13	0.91	0.83			
	H_δ	8	4.32	4.19			
	H_{ϵ^*}	7	2.52	2.53			
			2.32	2.36			
	Me^{O}	9	3.28				
Pro	Me^{N}	14	2.93				
	H_α	2	4.44	4.65	4.52		
	H_{β^*}	3	1.98	2.06	2.00		
	H_{γ^*}	4	2.29	2.32	2.24		
			2.13	2.06			
Linker	H_{δ^*}	5	3.65	3.46	3.66		
	H^{N}		6.94	6.64	6.42		
	H_{2^*}	27	3.48	3.54	3.30		
	H_{3^*}	28	1.43	1.62	1.62		
	H_{4^*}	29	1.33	1.44	1.42		
	H_{5^*}	30	1.27	1.25	1.28		
	H_{6^*}	31	1.33	1.44	1.42		
	H_{7^*}	32	1.43	1.62	1.62		
	H_{8^*}	33	3.05	3.14	2.45		

Tabelle 7.5: ^1H -chemische Verschiebung von **16a** in DMSO bei 300 K

Rest	Proton	Nr.	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
Dov	H $_{\alpha}$	21	3.74			
	H $_{\beta}$	22	2.00			
	H $_{\gamma^*}$	23	0.77			
		24				
	Me ^N	25	2.83			
Val	H _N		7.93	7.16	6.59	
	H $_{\alpha}$	16	4.16	4.12	4.21	
	H $_{\beta}$	17	1.88	1.87	1.83	
	H $_{\gamma^*}$	18	0.87	0.82	0.83	
		19			0.66	
Dav	H $_{\alpha}$	10	3.68	3.67		
	H $_{\beta}$	11	1.87	1.77		
	H $_{\gamma^*}$	12	0.87	0.91		
		13	0.65	0.77		
	H $_{\delta}$	8	4.18	4.00		
	H $_{\epsilon^*}$	7	2.30	2.08		
	Me ^O	9	3.35	3.23		
	Me ^N	14	2.82	2.92		
Pro	H $_{\alpha}$	2	4.16	4.05	4.10	
	H $_{\beta^*}$	3	1.78	1.85	1.69	
			1.67	1.68	1.87	
	H $_{\gamma^*}$	4	2.03	2.07	2.09	
	H $_{\delta^*}$	5	3.22	3.24	3.23	
Linker	H ^N		7.53	7.48	7.23	7.11
	H $_{2^*}$	27	2.60	2.58	2.42	2.43
	H $_{3^*}$	28	1.33	1.29	1.32	1.30
	H $_{4^*}$	29	1.21	1.12	1.21	1.20
	H $_{5^*}$	30	1.33	1.29	1.32	1.30
	H $_{6^*}$	31	2.86	3.02	2.82	2.84

Tabelle 7.6: ^1H -chemische Verschiebung von **16a** in CD₃OH bei 300 K

Rest	Proton	Nr.	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
Dov	H $_{\alpha}$	21	3.85	3.35					
	H $_{\beta}$	22	2.24	1.83					
	H $_{\gamma^*}$	23	0.91	0.89					
		24	0.79	0.75					
	Me ^N	25	2.88	2.87					
Val	H _N		8.13	8.01	7.90	7.75	7.65	7.53	6.85
	H $_{\alpha}$	16	4.15	4.15	4.55	4.19	3.36	3.39	4.11
	H $_{\beta}$	17	2.07	2.26	2.02	1.99	1.84	1.80	1.96
	H $_{\gamma^*}$	18	0.95	0.90	0.92	0.98	0.90	0.87	0.92
		19				0.92	0.76	0.67	0.78
Dav	H $_{\alpha}$	10	3.88	3.59					
	H $_{\beta}$	11	2.00	2.20					

Tabelle 7.6 (Fotrs.)

Rest	Proton	Nr.	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
Dav	H _γ *	12	0.92	1.05					
		13	0.80						
	H _δ	8	4.23	4.25					
	H _ε *	7	2.48	2.44					
	Me ^O	9	3.24	3.22					
	Me ^N	14	2.89	2.87					
Pro	H _α	2	4.23	4.25	4.38	4.54	4.54	4.25	
	H _β *	3	2.15	2.01	1.95	1.94	1.94	1.95	
				1.89	1.81	1.80	1.82	1.82	
	H _γ *	4	2.31	2.22	2.21	2.19	2.20	2.18	
	H _δ *	5	3.89	3.59	3.54	2.52	3.44	3.42	
Linker	H ^N		8.05	8.02	7.97	7.79	7.65	7.57	7.50
	H ₂ *	27	3.26	3.28	3.30	3.27	3.34	3.15	3.15
	H ₃ *	28	1.44	1.41	1.42	1.44	1.44	1.40	1.38
	H ₄ *	29	1.29	1.20	1.24	1.30	1.24	1.23	1.24
	H ₅ *	30	1.44	1.41	1.42	1.44	1.44	1.40	1.38
	H ₆ *	31	2.95	2.79	2.83	2.89	3.19	3.09	3.07

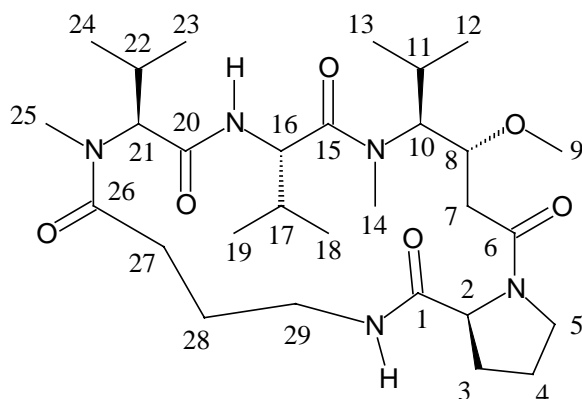
7.1.2 NMR-Spektroskopie und Zuordnung von **16b**

Tabelle 7.7: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für **16b** in CDCl₃. Alle Spektren wurden bei 300 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B ₀ [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ _m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	599.87	512 4096	8398.2 8389.3	-	32	512 4096
TOCSY	599.87	512 4096	8398.2 8389.3	70	24	1024 4096
HSQC	150.90 600.13	512 4096	27155.5 6009.6	-	32	512 4096
HMBC	150.90 600.13	512 4096	30183.6 6009.6	-	64	512 4096

Tabelle 7.8: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für **16b** in H₂O mit 10 % D₂O. Alle Spektren wurden bei 300 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B ₀ [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ _m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	600.13	512 4096	7198.8 7183.9	-	16	1024 8192
TOCSY	600.13	512 4096	7198.8 7183.9	70	16	1024 4096

Abb. 7.2: Strukturformel von **16b**

Die Verbindung **16b** liegt in CDCl_3 in vier und in H_2O in sieben Konformeren vor. Die Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebung von **16b** in CDCl_3 und H_2O ist in Tabelle 7.9 und Tabelle 7.10 angegeben. Die Signale in den Spektren sind zum Teil sehr stark durch konformationellen Austausch verbreitert. Die sequentielle Zuordnung der einzelnen Spinsysteme in einem Konformer war wegen der starken Überlagerung im ROESY-Spektrum nicht möglich.

Tabelle 7.9: ^1H -chemische Verschiebung von **16b** in CDCl_3 bei 300 K

Rest	Proton	Nr.	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
Dov	H_α	21	4.83	5.05		
	H_β	22	2.16	2.36		
	H_{γ^*}	23	1.15	0.99		
		24	0.89	0.77		
	Me^{N}	25	3.03	2.99		
Val	H_{N}		8.38	6.74		
	H_α	16	4.58	4.59		
	H_β	17	2.06	2.09		
	H_{γ^*}	18	1.03	1.00		
		19				
Dav	H_α	10	3.55	3.51		
	H_β	11	2.31	1.77		
	H_{γ^*}	12	1.21	1.03		
		13	0.90	0.88		
	H_δ	8	4.21	4.68		
	H_{ϵ^*}	7	2.68	2.48		
	Me^{O}	9	3.37	3.38		
	Me^{N}	14	3.15	3.05		

Tabelle 7.9 (Forts.)

Rest	Proton	Nr.	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
Pro	H $_{\alpha}$	2	4.63	4.45	4.37	
	H $_{\beta^*}$	3	2.09	2.08	1.94	
			1.96	1.83		
	H $_{\gamma^*}$	4	2.28	2.32	2.28	
	H $_{\delta^*}$	5	3.56	3.65	3.63	
Linker	H N		8.36	7.88	7.40	6.87
	H $_{2^*}$	27	3.67	3.44	3.78	3.69
	H $_{3^*}$	28	1.95	1.91	2.05	1.85
	H $_{4^*}$	29	3.04	2.54	3.04	3.06
			2.79			

Tabelle 7.10: ^1H -chemische Verschiebung von **16b** in H₂O bei 300 K

Rest	Proton	Nr.	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
Dov	H $_{\alpha}$	21	4.53	4.36	4.48				
	H $_{\beta}$	22	2.14	1.91	1.81				
	H $_{\gamma^*}$	23	0.78	0.93	0.93				
		24		0.75	0.75				
	Me N	25	2.89	2.86	2.84				
Val	H $_N$		8.58	8.37	8.30	8.21	8.15	8.07	7.92
	H $_{\alpha}$	16	4.20	4.63	4.65	4.28	4.31	4.39	4.59
	H $_{\beta}$	17	1.98	1.99	2.03	1.96	1.94	1.93	1.98
	H $_{\gamma^*}$	18	0.95	0.91	0.92	0.88	0.90	0.83	0.88
		19							0.81
Dav	H $_{\alpha}$	10	4.01	3.92					
	H $_{\beta}$	11	1.94	1.73					
	H $_{\gamma^*}$	12	0.91	0.91					
		13	0.73	0.74					
	H $_{\delta}$	8	4.54	4.41					
	H $_{\epsilon^*}$	7	2.66	2.66					
			2.50	2.58					
	Me O	9	3.19	3.15					
Pro	Me N	14	2.97	2.87					
	H $_{\alpha}$	2	4.36	4.48					
	H $_{\beta^*}$	3	1.93	2.02					
				1.84					
	H $_{\gamma^*}$	4	2.18	2.30					
Linker	H $_{\delta^*}$	5	3.57	3.50					
	H N		8.42	8.36	8.32	8.05	1.99	7.88	7.74
	H $_{2^*}$	27	3.16	3.26	3.15	3.37	3.17	3.23	3.33
			3.03	3.05		2.99		3.11	3.09
	H $_{3^*}$	28	1.74	1.72	1.74	1.72	1.70	1.71	1.76
									1.66
	H $_{4^*}$	29	2.54	2.49	2.45	2.51	2.41	2.39	2.40
			2.41			2.43			2.30

7.1.3 NMR-Spektroskopie und Zuordnung von **16c**

Tabelle 7.11: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für **16c** in CDCl₃. Alle Spektren wurden bei 300 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B ₀ [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ _m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	600.13	512 4096	6613.7 6613.7	-	48	1024 8192
TOCSY	600.13	512 4096	6613.7 6613.7	70	64	1024 4096
ROESY	150.90 600.13	512 4096	6613.7 6613.7	300	64	512 4096
HSQC	150.90 600.13	512 4096	15091.6 4807.7	-	96	512 4096

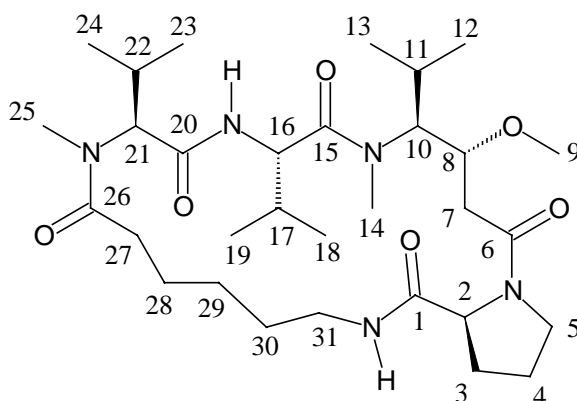


Abb. 7.3: Strukturformel von **16c**

Die Verbindung **16c** liegt in CDCl₃ in vier Konformeren vor. Die Zuordnung der ¹H-chemischen Verschiebung von **16c** in CDCl₃ ist in Tabelle 7.12 angegeben. Die Signale in den Spektren sind zum Teil sehr stark durch konformationellen Austausch verbreitert. Die sequentielle Zuordnung der einzelnen Spinsysteme in einem Konformer war wegen der starken Überlagerung im ROESY-Spektrum nicht möglich.

Tabelle 7.12: ¹H-chemische Verschiebung von **16c** in CDCl₃ bei 300 K

Rest	Proton	Nr.	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
Dov	H _α	21	5.21	4.16	4.51	
	H _β	22	2.12	2.09	2.07	
	H _γ *	23	0.79	0.96	0.93	
		24		0.72		
	Me ^N	25	3.05	2.97	2.96	

Tabelle 7.12 (Forts.)

Rest	Proton	Nr.	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
Val	H _N		8.86	7.98	7.92	6.99
	H _{α}	16	4.52	4.54	4.59	4.70
	H _{β}	17	2.08	2.06	2.12	2.06
	H _{γ^*}	18	0.95	0.94	0.91	0.95
		19	0.92	0.89		0.85
Dav	H _{α}	10	4.07	3.88	3.91	
	H _{β}	11	1.89	2.11	2.09	
	H _{γ^*}	12	1.07	0.98	0.97	
		13	0.85	0.73	0.76	
	H _{δ}	8	4.77	4.16	4.26	
	H _{ϵ^*}	7	2.56	2.52	2.48	
			2.42	2.42		
	Me ^O	9	3.38	3.36	3.35	
Pro	Me ^N	14	3.15	3.14	3.09	
	H _{α}	2	4.65	4.60	4.47	
	H _{β^*}	3	2.01	2.08	1.95	
			1.90	1.89	1.86	
	H _{γ^*}	4	2.41	2.41	2.16	
	H _{δ^*}	5	3.64	3.65	3.60	
Linker			3.43	3.44		
	H ^N		7.55	7.41	7.35	7.20
	H _{2*}	27	3.50	3.39	3.41	3.33
	H _{3*}	28	1.73	1.54	1.62	1.62
	H _{4*}	29	1.43	1.39	1.38	1.36
	H _{5*}	30	1.73	1.54	1.62	1.62
	H _{6*}	31	3.13	3.05	3.17	3.09

7.1.4 NMR-Spektroskopie und Zuordnung von **35a**

Tabelle 7.13: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für **35a** in CD₂Cl₂. Alle Spektren wurden bei 290 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B ₀ [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ_m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	600.13	512 4096	6613.76 6613.76	-	64	512 4096
TOCSY	600.13	512 4096	6613.76 6613.76	70	16	512 4096
ROESY	600.13	512 4096	6613.76 6613.76	300	48	512 4096

Tabelle 7.14: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für **35a** in H_2O . Alle Spektren wurden bei 290 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B_0 [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ_m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	600.13	512 4096	6009.61 6009.61	-	48	512 4096
TOCSY	600.13	512 4096	6009.61 6009.61	70	16	1024 8192
ROESY	600.13	512 4096	6009.61 6009.61	300	64	1024 8192
HSQC	600.13 150.91	512 4096	6009.61 15091.63	-	12	512 4096
HMBC	600.13 150.91	1024 4096	6009.61 30183.57	-	32	1024 8192

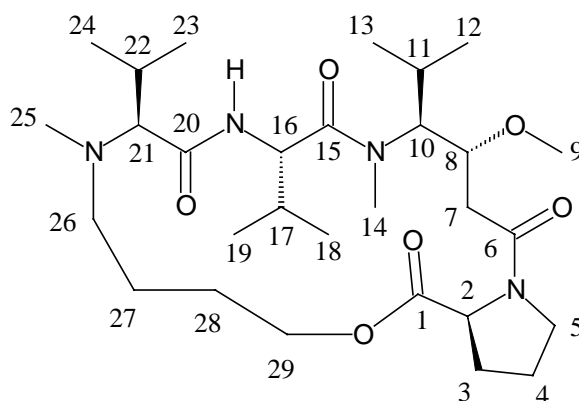


Abb. 7.1: Strukturformel von **35a**

Die Verbindung **35a** liegt in CD_2Cl_2 und in H_2O in einer Konformation vor. Die Zuordnung der 1H -chemischen Verschiebung von **35a** in den beiden Lösungsmitteln ist in Tabelle 7.15 angegeben.

Tabelle 7.15: 1H -chemische Verschiebung von **35a** a) in CD_2Cl_2 und b) in H_2O bei 290 K

Rest	Proton	Nr.	a) δ (ppm)	b) δ (ppm)
Dov	H_α	21	4.00	3.52
	H_β	22	2.21	1.96
	H_{γ^*}	23	1.00	0.80
		24	0.89	0.72
	Me^N	25	2.63	2.46

Tabelle 7.15 (Forts.)

Rest	Proton	Nr.	a) δ (ppm)	b) δ (ppm)
Val	H _N		8.44	8.66
	H _{α}	16	4.86	4.50
	H _{β}	17	2.03	1.83
	H _{γ^*}	18	0.97	0.78
		19		
Dav	H _{α}	10	4.75	4.32
	H _{β}	11	2.00	1.79
	H _{γ^*}	12	0.95	0.77
		13	0.81	0.59
	H _{δ}	8	3.80	3.85
	H _{ϵ^*}	7	2.62	2.49
			2.55	2.35
	Me ^O	9	3.29	3.14
	Me ^N	14	3.03	2.97
Pro	H _{α}	2	4.37	4.20
	H _{β^*}	3	2.14	2.09
	H _{γ^*}	4	2.06	1.81
			1.97	
	H _{δ^*}	5	3.66	3.43
			3.48	
Linker	H _{1*}	29	3.47	3.37
			3.38	3.28
	H _{2*}	28	1.69	1.73
	H _{3*}	27	1.58	1.66
	H _{4*}	26	2.34	2.15
				1.97

7.1.5 NOE-restraints für die Strukturrechnung von **35a**

```

assign (resi 1 and name HB) (resi 1 and name HA ) 4.00 4.00 0.00
assign (resi 1 and name HB) (resi 1 and name HM* ) 5.50 5.50 0.00
assign (resi 1 and name HB) (resi 3 and name HA ) 2.80 2.80 0.00
assign (resi 1 and name HG1* ) (resi 1 and name HA ) 4.30 4.30 0.00
assign (resi 1 and name HG1* ) (resi 1 and name HB ) 4.30 4.30 0.00
assign (resi 1 and name HG1* ) (resi 1 and name HM* ) 7.00 7.00 0.00
assign (resi 1 and name HG2* ) (resi 1 and name HA ) 4.30 4.30 0.00
assign (resi 1 and name HG2* ) (resi 1 and name HB ) 4.30 4.30 0.00
assign (resi 1 and name HG2* ) (resi 1 and name HM* ) 7.00 7.00 0.00
assign (resi 1 and name HM* ) (resi 1 and name HA ) 4.00 4.00 0.00
assign (resi 2 and name HB ) (resi 2 and name HA ) 2.80 2.80 0.00
assign (resi 2 and name HB ) (resi 3 and name HM* ) 5.00 5.00 0.00
assign (resi 2 and name HG* ) (resi 2 and name HA ) 4.30 4.30 0.00
assign (resi 2 and name HG* ) (resi 2 and name HB ) 4.30 4.30 0.00
assign (resi 2 and name HN ) (resi 1 and name HA ) 2.80 2.80 0.00
assign (resi 2 and name HN ) (resi 1 and name HB ) 5.00 5.00 0.00
assign (resi 2 and name HN ) (resi 1 and name HM* ) 5.50 5.50 0.00
assign (resi 2 and name HN ) (resi 2 and name HA ) 2.80 2.80 0.00
assign (resi 2 and name HN ) (resi 2 and name HB ) 4.00 4.00 0.00
assign (resi 2 and name HN ) (resi 2 and name HG* ) 4.30 4.30 0.00
assign (resi 3 and name HA1 ) (resi 3 and name HA ) 2.80 2.80 0.00
assign (resi 3 and name HA21 ) (resi 3 and name HA ) 5.00 5.00 0.00

```

assign (resi 3 and name HA21)	(resi 3 and name HA1)	2.80	2.80	0.00
assign (resi 3 and name HA21)	(resi 3 and name HM*)	4.00	4.00	0.00
assign (resi 3 and name HA21)	(resi 4 and name HA)	2.80	2.80	0.00
assign (resi 3 and name HA22)	(resi 3 and name HA)	4.00	4.00	0.00
assign (resi 3 and name HA22)	(resi 3 and name HA1)	5.00	5.00	0.00
assign (resi 3 and name HA22)	(resi 3 and name HM*)	5.50	5.50	0.00
assign (resi 3 and name HA22)	(resi 3 and name HP*)	5.50	5.50	0.00
assign (resi 3 and name HA22)	(resi 4 and name HA)	4.30	4.30	0.00
assign (resi 3 and name HB)	(resi 3 and name HA)	2.80	2.80	0.00
assign (resi 3 and name HB)	(resi 3 and name HA1)	5.00	5.00	0.00
assign (resi 3 and name HB)	(resi 3 and name HM*)	5.50	5.50	0.00
assign (resi 3 and name HB)	(resi 3 and name HP*)	5.50	5.50	0.00
assign (resi 3 and name HG1*)	(resi 3 and name HA)	4.30	4.30	0.00
assign (resi 3 and name HG1*)	(resi 3 and name HA1)	4.30	4.30	0.00
assign (resi 3 and name HG1*)	(resi 3 and name HA21)	5.50	5.50	0.00
assign (resi 3 and name HG1*)	(resi 3 and name HA22)	5.50	5.50	0.00
assign (resi 3 and name HG1*)	(resi 3 and name HB)	4.30	4.30	0.00
assign (resi 3 and name HG1*)	(resi 3 and name HM*)	7.00	7.00	0.00
assign (resi 3 and name HG1*)	(resi 3 and name HP*)	7.00	7.00	0.00
assign (resi 3 and name HG2*)	(resi 3 and name HA)	4.30	4.30	0.00
assign (resi 3 and name HG2*)	(resi 3 and name HA1)	5.50	5.50	0.00
assign (resi 3 and name HG2*)	(resi 3 and name HA21)	5.50	5.50	0.00
assign (resi 3 and name HG2*)	(resi 3 and name HA22)	6.50	6.50	0.00
assign (resi 3 and name HG2*)	(resi 3 and name HB)	4.30	4.30	0.00
assign (resi 3 and name HG2*)	(resi 3 and name HM*)	5.80	5.80	0.00
assign (resi 3 and name HG2*)	(resi 3 and name HP*)	8.00	8.00	0.00
assign (resi 3 and name HM*)	(resi 2 and name HA)	4.00	4.00	0.00
assign (resi 3 and name HM*)	(resi 3 and name HA)	5.50	5.50	0.00
assign (resi 3 and name HM*)	(resi 3 and name HA1)	5.50	5.50	0.00
assign (resi 3 and name HP*)	(resi 3 and name HA)	4.30	4.30	0.00
assign (resi 3 and name HP*)	(resi 3 and name HA1)	4.00	4.00	0.00
assign (resi 4 and name HB*)	(resi 4 and name HA)	3.70	3.70	0.00
assign (resi 4 and name HB*)	(resi 4 and name HD*)	4.80	4.80	0.00
assign (resi 4 and name HD*)	(resi 4 and name HA)	4.80	4.80	0.00
assign (resi 4 and name HG*)	(resi 4 and name HA)	4.50	4.50	0.00
assign (resi 4 and name HG*)	(resi 4 and name HB*)	4.60	4.60	0.00
assign (resi 4 and name HG*)	(resi 4 and name HD*)	4.60	4.60	0.00
assign (resi 5 and name HA1)	(resi 4 and name HA)	5.00	5.00	0.00
assign (resi 5 and name HA2)	(resi 4 and name HA)	5.00	5.00	0.00
assign (resi 5 and name HB*)	(resi 5 and name HA1)	3.70	3.70	0.00
assign (resi 5 and name HB*)	(resi 5 and name HA2)	3.70	3.70	0.00
assign (resi 5 and name HB*)	(resi 5 and name HD1)	3.70	3.70	0.00
assign (resi 5 and name HB*)	(resi 5 and name HD2)	4.90	4.90	0.00
assign (resi 5 and name HC*)	(resi 5 and name HA1)	3.70	3.70	0.00
assign (resi 5 and name HC*)	(resi 5 and name HA2)	3.70	3.70	0.00
assign (resi 5 and name HC*)	(resi 5 and name HD1)	4.90	4.90	0.00
assign (resi 5 and name HC*)	(resi 5 and name HD2)	3.70	3.70	0.00
assign (resi 5 and name HD1)	(resi 1 and name HA)	4.00	4.00	0.00
assign (resi 5 and name HD1)	(resi 5 and name HA1)	5.00	5.00	0.00
assign (resi 5 and name HD1)	(resi 5 and name HA2)	5.00	5.00	0.00
assign (resi 5 and name HD2)	(resi 1 and name HA)	4.00	4.00	0.00
assign (resi 5 and name HD2)	(resi 3 and name HM*)	5.00	5.00	0.00
assign (resi 5 and name HD2)	(resi 5 and name HA1)	5.00	5.00	0.00
assign (resi 5 and name HD2)	(resi 5 and name HA2)	4.00	4.00	0.00
assign (resi 5 and name HD2)	(resi 5 and name HD1)	2.80	2.80	0.00

7.1.6 NMR-Spektroskopie und Zuordnung von **35b**

Tabelle 7.16: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für **35b** in CD_2Cl_2 . Alle Spektren wurden bei 290 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B ₀ [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ _m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	600.13	512 4096	5387.93 5387.93	-	48	512 4096
TOCSY	600.13	512 4096	5387.93 5387.93	70	16	512 4096
ROESY	600.13	512 4096	5387.93 5387.93	100	48	1024 4096
ROESY	600.13	512 4096	5387.93 5387.93	250	48	1024 4096
HSQC	600.13 150.91	512 4096	5387.93 15091.63	-	4	512 4096
HMBC	600.13 150.91	786 4096	5387.93 30183.57	-	32	512 4096

Tabelle 7.17: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für **35b** in H_2O . Alle Spektren wurden bei 290 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B ₀ [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ _m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	600.13	512 4096	7183.91 7183.91	-	48	512 4096
TOCSY	600.13	512 4096	7183.91 7183.91	70	16	1024 8192
ROESY	600.13	512 4096	7183.91 7183.91	300	48	1024 8192

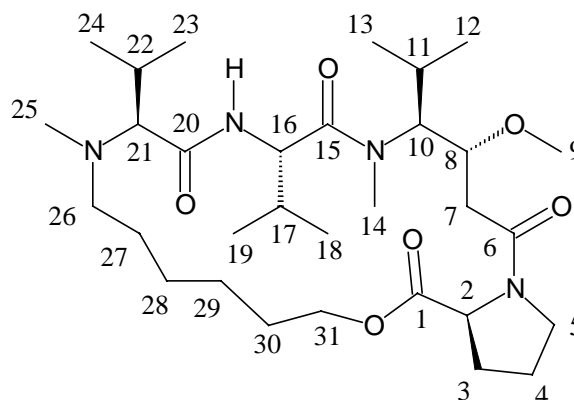


Abb. 7.1: Strukturformel von **35b**

Die Verbindung **35b** liegt in CD_2Cl_2 und in H_2O in einer Konformation vor. Die Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebung von **35b** in den beiden Lösungsmittel ist in Tabelle 7.18 angegeben.

Tabelle 7.18: ^1H -chemische Verschiebung von **35b** a) in CD_2Cl_2 und b) in H_2O bei 290 K

Rest	Proton	Nr.	a) δ (ppm)	b) δ (ppm)
Dov	H_α	21	3.74	3.75
	H_β	22	2.24	2.34
	H_{γ^*}	23	1.08	0.95
		24	0.91	0.84
	Me^{N}	25	2.91	2.85
Val	H_{N}		7.48	8.84
	H_α	16	4.71	4.62
	H_β	17	2.06	2.02
	H_{γ^*}	18	1.01	1.01
		19	0.93	0.93
Dav	H_α	10	4.54	4.44
	H_β	11	1.97	1.92
	H_{γ^*}	12	0.97	0.92
		13	0.78	0.74
	H_δ	8	3.95	3.95
	H_{ϵ^*}	7	2.48	2.59
			2.35	2.51
	Me^{O}	9	3.34	3.27
	Me^{N}	14	3.01	3.08
Pro	H_α	2	4.39	4.36
	H_{β^*}	3	2.15	2.15
			1.94	1.94
	H_{γ^*}	4	2.02	1.93
	H_{δ^*}	5	3.67	3.68
			3.43	3.439
Linker	H_{1^*}	31	3.57	4.09
	H_{2^*}	30	1.51	1.60
	H_{3^*}	29	1.36	1.32
	H_{4^*}	28	1.37	1.30
	H_{5^*}	27	1.78	1.70
				1.60
	H_{6^*}	26	3.25	3.25
			3.11	3.12

7.1.7 NOE-restraints für die Strukturrechnung von **35b**

```

assign (resi 1 and name HB) (resi 1 and name HA) 3.07 3.07 0.00
assign (resi 1 and name HB) (resi 1 and name HM*) 4.52 3.02 0.00
assign (resi 1 and name HB) (resi 3 and name HM*) 6.50 6.50 0.00
assign (resi 1 and name HG1*) (resi 1 and name HA) 5.12 3.62 0.00
assign (resi 1 and name HG1*) (resi 1 and name HB) 4.64 3.14 0.00

```

assign (resi	1 and name HG1*)	(resi	1 and name HM*)	8.00	5.00	0.00
assign (resi	1 and name HG2*)	(resi	1 and name HA)	5.71	4.21	0.00
assign (resi	1 and name HG2*)	(resi	1 and name HB)	4.71	3.21	0.00
assign (resi	1 and name HG2*)	(resi	1 and name HM*)	7.60	4.60	0.00
assign (resi	1 and name HG2*)	(resi	3 and name HM*)	8.00	5.00	0.00
assign (resi	1 and name HM*)	(resi	1 and name HA)	4.99	3.49	0.00
assign (resi	2 and name HB)	(resi	2 and name HA)	2.80	2.80	0.00
assign (resi	2 and name HG*)	(resi	2 and name HA)	3.88	4.88	0.00
assign (resi	2 and name HG*)	(resi	2 and name HB)	6.25	3.25	0.00
assign (resi	2 and name HN)	(resi	1 and name HA)	3.70	3.70	0.00
assign (resi	2 and name HN)	(resi	2 and name HA)	3.32	3.32	0.00
assign (resi	2 and name HN)	(resi	2 and name HB)	4.27	4.27	0.00
assign (resi	2 and name HN)	(resi	2 and name HG*)	7.39	4.39	0.00
assign (resi	3 and name HA21)	(resi	3 and name HA)	4.97	4.97	0.00
assign (resi	3 and name HA21)	(resi	3 and name HA1)	3.37	3.37	0.00
assign (resi	3 and name HA21)	(resi	3 and name HM*)	5.45	3.95	0.00
assign (resi	3 and name HA21)	(resi	4 and name HD*)	4.62	3.72	0.00
assign (resi	3 and name HA22)	(resi	3 and name HA)	4.51	4.51	0.00
assign (resi	3 and name HA22)	(resi	3 and name HA1)	4.09	4.09	0.00
assign (resi	3 and name HA22)	(resi	3 and name HM*)	5.19	3.69	0.00
assign (resi	3 and name HA22)	(resi	4 and name HD*)	4.20	3.30	0.00
assign (resi	3 and name HB)	(resi	3 and name HA)	3.93	3.93	0.00
assign (resi	3 and name HB)	(resi	3 and name HA1)	3.86	3.86	0.00
assign (resi	3 and name HB)	(resi	3 and name HM*)	4.80	3.30	0.00
assign (resi	3 and name HG1*)	(resi	3 and name HA)	5.45	3.95	0.00
assign (resi	3 and name HG1*)	(resi	3 and name HA1)	4.99	3.49	0.00
assign (resi	3 and name HG1*)	(resi	3 and name HB)	4.67	3.17	0.00
assign (resi	3 and name HG1*)	(resi	3 and name HM*)	7.64	4.64	0.00
assign (resi	3 and name HG1*)	(resi	3 and name HP*)	7.94	4.94	0.00
assign (resi	3 and name HG2*)	(resi	3 and name HA)	5.62	4.12	0.00
assign (resi	3 and name HG2*)	(resi	3 and name HA1)	6.50	5.00	0.00
assign (resi	3 and name HG2*)	(resi	3 and name HB)	4.78	3.28	0.00
assign (resi	3 and name HG2*)	(resi	3 and name HM*)	7.64	4.64	0.00
assign (resi	3 and name HM*)	(resi	3 and name HA)	6.50	5.00	0.00
assign (resi	3 and name HM*)	(resi	3 and name HA1)	5.90	4.40	0.00
assign (resi	3 and name HP*)	(resi	3 and name HA)	5.24	3.74	0.00
assign (resi	3 and name HP*)	(resi	3 and name HA1)	4.73	3.23	0.00
assign (resi	4 and name HB*)	(resi	4 and name HA)	4.05	3.15	0.00
assign (resi	4 and name HB*)	(resi	4 and name HD*)	5.88	4.08	0.00
assign (resi	4 and name HD*)	(resi	4 and name HA)	5.20	4.30	0.00
assign (resi	4 and name HG*)	(resi	3 and name HA21)	5.56	5.56	0.00
assign (resi	4 and name HG*)	(resi	4 and name HA)	4.48	3.58	0.00
assign (resi	4 and name HG*)	(resi	4 and name HB*)	4.76	2.96	0.00
assign (resi	4 and name HG*)	(resi	4 and name HD*)	4.84	3.04	0.00
assign (resi	5 and name HB*)	(resi	5 and name HA*)	5.25	3.45	0.00
assign (resi	5 and name HC*)	(resi	5 and name HA*)	5.60	3.80	0.00
assign (resi	5 and name HC*)	(resi	5 and name HB*)	4.80	3.00	0.00
assign (resi	5 and name HD*)	(resi	1 and name HM*)	7.40	5.00	0.00
assign (resi	5 and name HD*)	(resi	5 and name HF*)	5.08	3.28	0.00
assign (resi	5 and name HE1)	(resi	1 and name HA)	4.79	4.79	0.00
assign (resi	5 and name HE1)	(resi	1 and name HM*)	4.77	3.27	0.00
assign (resi	5 and name HE1)	(resi	5 and name HF*)	4.06	3.16	0.00
assign (resi	5 and name HE2)	(resi	5 and name HF*)	5.90	5.00	0.00
assign (resi	5 and name HF*)	(resi	1 and name HA)	4.37	3.47	0.00

7.2 Kinetische Messungen der cis-trans-Isomerisierung von 41

Die kinetischen Messungen wurden nach Zugabe von 20 µl Stammlösung von 41 gelöst in DMSO-d⁶ oder Methanol-d³ zu 500 µl 10 mM Phosphatpuffer mit 10 % D₂O bei 277 K an einem DRX600-Spektrometer bei 600 MHz der Firma Bruker, Karlsruhe, durchgeführt. Nach einer Totzeit von 90-100 Sekunden wurde eine Serie von 256 eindimensionalen ¹H-Spektren mit jeweils 64 Transienten aufgenommen, die zur einfacheren Verarbeitung in einem zweidimensionalen seriellen Datensatz gespeichert wurden. Das Wassersignal wurde durch Anwendung von Gradienten (WATERGATE) [123] reduziert. Die Spektren wurden mit einer exponentiellen Windowfunktion entlang der direkten Dimension auf 4 K reale Datenpunkte im Amidbereich prozessiert. Die Integrale der Signale des cis- und des trans-Konformers wurden mithilfe einer automatischen Routine des Programmes UXNMR, Version 2.6 (Bruker Instruments, Rheinstetten), ermittelt.

7.3 Formel zur Bestimmung der Kinetik der cis-trans-Isomerisierung von 41

Die Kinetik der cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung zwischen der Dolavain-Einheit und des Prolins in 41 wurde nach dem Prinzip der chemischen Relaxation in Gleichgewichtsnähe bestimmt. Die Zeitabhängigkeit der Änderung der Konzentration des cis-Konformers wird durch Gleichung 7.1 beschrieben.

$$\frac{d[cis]_t}{dt} = -k_c[cis]_t + k_t[cis]_t \quad 7.1$$

mit $[cis]_t$ als Konzentration des cis-Konformers zum Zeitpunkt t.

Mit x als zeitabhängige Reaktionsvariable:

$$\frac{dx}{dt} = -k_c(x + [cis]_\infty) + k_t(-x + [trans]_\infty) = -(k_c + k_t)x \quad 7.2$$

mit $[cis]_{\infty}$ und $[trans]_{\infty}$ als Gleichgewichtskonzentration des cis- und des trans-Konformers.

Durch Lösen der Differentialgleichung 7.2 erhält man:

$$x_t = x_0 \exp(-(k_c + k_t)t) \quad 7.3$$

Mit $x_t = [cis]_t - [cis]_{\infty}$ und $x_0 = [cis]_0 - [cis]_{\infty}$ ergibt sich:

$$[cis]_t = [cis]_{\infty} + ([cis]_0 - [cis]_{\infty}) \exp(-(k_c + k_t)t) \quad 7.4$$

mit $[cis]_0$ als Konzentration des cis-Konformers zum Zeitpunkt 0.

Der Exponent in Gleichung 7.4 läßt sich durch die Gleichgewichtsbedingung $-k_c[cis]_{\infty} + k_t[trans]_{\infty} = 0$ zu folgender Formel vereinfachen:

$$[cis]_t = [cis]_{\infty} + ([cis]_0 - [cis]_{\infty}) \exp\left(-\frac{k_c t}{[trans]_{\infty}}\right) \quad 7.5$$

Die Herleitung der Gleichung zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_t verläuft analog zu der oben beschriebenen und wird deshalb nur verkürzt gezeigt.

Die Zeitabhängigkeit der Änderung der Konzentration des trans-Konformers wird durch Gleichung 7.6 beschrieben.

$$\frac{d[trans]_t}{dt} = k_c[trans]_t - k_t[trans]_t \quad 7.6$$

Nach Einführen der zeitabhängigen Reaktionsvariablen x und Lösen der Differentialgleichung erhält man:

$$x_t = x_0 \exp(-(k_c + k_t)t) \quad 7.7$$

Im Falle des trans-Konformers ist $x_t = [trans]_\infty - [trans]_t$ und $x_0 = [trans]_\infty - [trans]_0$.

Nach Substitution von k_c durch die Gleichgewichtsbedingung $-k_c[cis]_\infty + k_t[trans]_\infty = 0$

ergibt sich deshalb:

$$[trans]_t = [trans]_\infty - ([trans]_\infty - [trans]_0) \exp\left(-\frac{k_t t}{[cis]_\infty}\right) \quad 7.8$$

7.4 NMR-spektroskopische Bindungsstudien von ^{13}C -markiertem Colchicin und ^{15}N -markiertem Dolastatin 10-Derivat in Gegenwart von Tubulin

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen des ^{15}N -markiertem Dolastatin 10-Derivates **49** und des ^{13}C -markierte Colchicins **48** wurden an 100 μM Ligand-Lösungen in Gegenwart von Tubulin-Lösungen im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Die Protein-Konzentration wurde nach Bradford [68] bestimmt. Im Falle des Colchicins wurde der Linienbreitenstandard TSP der 1.5 M Ligand-Stammlösung zugesetzt. Das Tubulin wurde im Laufe der Präparation auf den NMR-Puffer (10 mM Pipes (pH 6.9), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 und 10 % D_2O) entweder mithilfe der Amicon-Zelle [71] im Falle des DEAE-Tubulins oder durch Auflösen des nach der Polymerisation anfallenden Niederschlags im Falle des MAP-Tubulins umgestellt. Die Zusammensetzung der NMR-Proben sind in Tabelle 7.19 aufgelistet.

Die NMR-Proben wurden eine Stunde vor der Messung bei 37 °C inkubiert und anschließend in ein 5 mm NMR-Röhrchen überführt.

Tabelle 7.19: NMR-Proben für die Bindungsstudien von ^{13}C -markiertem Colchicin und ^{15}N -markiertem Dolastatin 10-Derivat.

Proben-Nr.	Tubulin	Protein-Konzentration [mg/ml]	Volumen der Tubulin-Lösung [μl]	Ligand	Volumen der Ligand-Lösung [μl]
1	DEAE	12	500	Colchicin	33.3
2	MAP	15	500	Colchicin	33.3
3	DEAE	13	470	Dolastatin 10-Derivat	33.3
4	MAP	14	500	Dolastatin 10-Derivat	33.3

Alle Experimente wurden bei 310 K an einem DRX600 mit einem ^1H - ^{13}C - ^{15}N -Tripelresonanzprobenkopf (TXI) bei 600 MHz und einem DRX800 mit einem ^1H - ^{13}C - ^{15}N - ^{31}P -Quadrupolresonanzprobenkopf (QXI) bei 800 MHz der Firma Bruker, Karlsruhe, aufgenommen. Die Daten wurden mit dem Programm UYNMR, Version 2.6 (Bruker Instruments, Rheinstetten), unter Anwendung einer quadratischen Sinusfunktion in der indirekten Dimension prozessiert.

Die folgende Tabelle 7.20 und Tabelle 7.21 fassen die für die Datenacquisition und -prozessierung verwendeten Parameter der NMR-Experimente bei den Bindungsstudien der beiden Liganden am Tubulin zusammen.

Tabelle 7.20: Aufnahme- und Prozessierungsparameter der Bindungsstudien von **48** in Gegenwart von Tubulin. Alle Spektren wurden bei 310 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	Proben-Nr.	B_0 [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
HSQC	1	600.13 60.82	4096 64	6613.76 3018.18	256	8192 128
HSQC	2	600.13 60.82	4096 64	6613.76 3018.18	256	8192 128

Tabelle 7.21: Aufnahme- und Prozessierungsparameter der Bindungsstudien von **49** in Gegenwart von Tubulin. Alle Spektren wurden bei 310 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	Proben-Nr.	B ₀ [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
gekoppeltes HSQC	3	600.13 60.82	4096 32	6009.62 608.19	600	8192 64
TROSY	3	599.87 60.79	4096 64	5387.93 607.93	256	8192 128
gekoppeltes HSQC	4	600.13 60.82	4096 32	6613.76 608.18	512	8192 64
TROSY	4	600.13 60.82	4096 32	6613.76 608.18	256	8192 64
gekoppeltes HSQC	4	800.13 81.09	4096 32	8012.82 810.87	800	8192 64
TROSY	4	800.13 81.09	4096 32	8012.82 810.87	800	8192 64

Tabelle 7.22: Relative Integrale der Signale im Multiplett des cis- und trans-Konformer von **49**, sowie Gehalt des cis-Konformers von **49** mit und ohne DEAE-Tubulin und MAP-Tubulin in den ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren

	Integral(cis)	Integral(trans)	cis-Gehalt von 49
ohne Tubulin 600 MHz	7.92, 6.79 7.19, 6.82	24.9, 26.6 21.7, 22.1	24 %, 21 % 25 %, 24 %
ohne Tubulin 800 MHz	6.40, 6.82 6.63, 6.52	21.8, 21.7 20.4, 22.46	23 %, 24 % 25 %, 22 %
DEAE-Tubulin 600 MHz	4.91, 4.42 4.22, 3.36	5.50, 5.10 4.94, 4.64	47 %, 46 % 46 %, 45 %
MAP-Tubulin 600 MHz	6.44, 6.51 4.33, 3.09	16.0, 19.0 13.1, 14.6	27 %, 26 % 25 %, 18 %
MAP-Tubulin 800 MHz	5.39, 4.74 3.90, 2.48	15.4, 14.4 14.6, 15.0	26 %, 25 % 21 %, 14 %

7.5 Hammerhead Ribozym

7.5.1 Vanadat-Komplexe mit Nucleosiden und Nucleotiden

Die NMR-Messungen wurden an Lösungen von 10 mM Vanadat und 10 mM Uridin, Adenosin, 5'-Uridinmonophosphat und ApU durchgeführt, welche aus entsprechenden Stammlösungen der Verbindungen in D₂O angesetzt wurden. Das ApU wurde von Herrn Christian von der Heyden zur Verfügung gestellt. Im Falle der 100 mM Vanadat-Stammlösung wurde 182 mg Vanadium(V)-pentoxid mit 4 M NaOH in D₂O gelöst und mit 2 M HCl auf pH 7.0 eingestellt. Die NMR-Proben wurden vor der Messung zwei Stunden bei 60 °C inkubiert, zentrifugiert und der Überstand in ein 5 mm NMR-Röhrchen überführt. Wegen der geringen Löslichkeit von Adenosin in Wasser wurden 267 mg Adenosin in 1 ml D₂O aufgeschlämmt, 50 µl der Suspension entnommen und mit der Vanadat-Lösung versetzt. Die Messungen wurden an einem AMX400 mit einem ¹H-¹³C-BB-Tripelresonanzprobenkopf (TBI) bei 400 MHz der Firma Bruker, Karlsruhe, bei 300 K aufgenommen. Die Breitbandspule (BB) wurde auf ⁵¹V mit der Meßfrequenz von 105.19 MHz getuned. Die ⁵¹V-Spektren wurden auf den externen Standard VOCl₃ in CDCl₃ (0 ppm) referenziert. Die Acquisitions- und Prozessierungsparameter der ⁵¹V-Spektren sind in Tabelle 7.23 aufgeführt.

Tabelle 7.23: Aufnahme- und Prozessierungsparameter der ⁵¹V-Spektren der 10 mM Vanadat-Nucleosid/Nucleotide-Komplexe in D₂O. Alle Spektren wurden bei 300 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breite, c) Wartezeit zwischen den Transienten, d) Anzahl der Transienten, e) Prozessierte Punkte (real)

Probe	B ₀ [MHz]	TD ^a	SW [Hz] ^b	d1 [s] ^c	NS ^d	SI ^e
U-V	105.19	4096	16129.0	0.2	16384	8192
A-V	105.19	4096	16129.0	0.2	8192	8192
5'UMP-V	105.19	4096	16129.0	0.2	8192	8192
ApU-V	105.19	4096	16129.0	0.2	8192	8192

An der 10 mM Vanadat-Uridin-Komplexlösung wurden weitere homonucleare zweidimensionale NMR-Experiment durchgeführt, deren Acquisitions- und Prozessierungsparameter in Tabelle 7.24 zusammengefaßt sind.

Tabelle 7.24: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für den 10 mM Vanadat-Uridin-Komplex in D₂O. Alle Spektren wurden bei 300 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B ₀ [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ _m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	400.14	512 2048	4001.4 4032.3	-	32	1024 4096
TOCSY	400.14	512 2048	4001.4 4032.3	70	256	1024 4096
NOESY	600.13	512 4096	5387.9 5387.9	500	48	512 4096

7.5.2 Vanadat-Komplexe mit ternären RNA-Konstrukten

Die NMR-Messungen wurden an ca. 100 µM Lösungen der entsprechenden RNA-Konstrukte durchgeführt. Die RNA-Oligomere wurden von Herrn Prof. F. Eckstein, MPI Göttingen, zur Verfügung gestellt. Für die Untersuchungen der RNA-Proben in Abwesenheit von Vanadat wurden äquimolare Mengen des 34mer, 8mer und 6mer in 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl und 10 % D₂O bei pH 6.0 hergestellt und eine Minute bei 90 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und 250 µl in ein NMR-Röhrchen der Firma Shigemi überführt. Die Messungen wurden an einem DRX600 mit einem ¹H-¹³C-³¹P-Tripelresonanzprobenkopf (TXI) bei 600 MHz der Firma Bruker, Karlsruhe, aufgenommen. Von den insgesamt vier RNA-Konstrukten wurden jeweils 1D-*jump-and-return-echo*-Spektren und 2D-*jump-and-return-echo*-NOESYs bei 277 K aufgenommen. Die Acquisitions- und Prozessierungsparameter der NOESYs sind in Tabelle 7.25 aufgeführt.

Tabelle 7.25: Aufnahme- und Prozessierungsparameter der RNA-Konstrukte in 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl und 10 % D₂O, pH 6.0. Alle Spektren wurden bei 277 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

RNA-Konstrukt	Experiment	B ₀ [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ _m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
1	NOESY	600.13	512 4096	15603.5 15576.3	150	64	512 4096
2	NOESY	600.13	512 4096	15603.5 15576.3	150	64	512 4096
3	NOESY	600.13	512 4096	15603.5 15576.3	150	64	512 4096
4	NOESY	600.13	512 4096	15603.5 15576.3	150	64	512 4096

Für die 1 M Vanadat-Stammlösung wurde 1.82 g Vanadium(V)-pentoxid mit 4 M NaOH in H₂O gelöst und mit 2 M HCl auf pH 6.0 eingestellt. Die RNA-Proben wurden mit 2.5 µl der Vanadat-Stammlösung versetzt und 24 Stunden vor der NMR-Messung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die 1D-*jump-and-return-echo*-Spektren und 2D-*jump-and-return-echo*-NOESYs wurden bei 277 K an den vier RNA-Konstrukten in Gegenwart von Vanadat unter den oben genannten Bedingungen (Tabelle 7.25) wiederholt. Die ⁵¹V-Spektren wurden an einem DRX600 mit einem ¹H-BB-Probenkopf (BB) der Firma Bruker, Karlsruhe, aufgenommen. Die Breitbandspule (BB) wurde auf ⁵¹V mit der Meßfrequenz von 157.77 MHz getuned. Die ⁵¹V-Spektren wurden auf den externen Standard VOCl₃ in CDCl₃ (0 ppm) referenziert. Die Acquisitions- und Prozessierungsparameter der ⁵¹V-Spektren sind in Tabelle 7.26 aufgeführt.

Tabelle 7.26: Aufnahme- und Prozessierungsparameter der ⁵¹V-Spektren der RNA-Konstrukte in 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM Vanadat und 10 % D₂O, pH 6.0. Alle Spektren wurden bei 277 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breite, c) Wartezeit zwischen den Transienten, d) Anzahl der Transienten, e) Prozessierte Punkte (real)

RNA-Konstrukt	B ₀ [MHz]	TD ^a	SW [Hz] ^b	d1 [s] ^c	NS ^d	SI ^e
1	157.77	4096	31746.0	0.2	16384	8192
2	157.77	4096	31746.0	0.2	16384	8192
3	157.77	4096	31746.0	0.2	16384	8192
4	157.77	4096	31746.0	0.2	16384	8192

7.6 Phospholamban

7.6.1 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Messungen wurden an einer ca. 1 mM Lösung von Phospholamban (C41F) in CDCl_3 (99.96 %) und CD_3OH (99.8 %) im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Das Protein wurde von H. Schmid, ETH Zürich, mit Hilfe der Festphasensynthese hergestellt. Alle Experimente wurden bei 300 K an einem DRX600 bei 600 MHz und einem DRX800 bei 800 MHz der Firma Bruker, Karlsruhe, aufgenommen. Die Daten wurden mit dem Programm UXNMR, Version 2.6 (Bruker Instruments, Rheinstetten), unter Anwendung einer quadratischen Sinusfunktion in der indirekten Dimension prozessiert und mit dem Programm FELIX, Version 98, (MSI, San Diego) ausgewertet.

Die folgende Tabelle 7.27 faßt die für die Datenacquisition und –prozessierung verwendeten Parameter der NMR-Experimente am Phospholamban (C41F) zusammen.

Tabelle 7.27: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für Phospholamban (C41F). Alle Spektren wurden bei 300 K gemessen. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Spektrale Breiten, c) Mischzeit, d) Anzahl der Transienten pro Inkrement, e) Prozessierte Punkte (real)

	B_0 [MHz]	TD1 ^a TD2 ^a	SW1 [Hz] ^b SW2 [Hz] ^b	τ_m [ms] ^c	NS ^d	SI1 ^e SI2 ^e
DQF-COSY	800.13	768 4096	8801.9 8802.8	-	32	1024 8192
TOCSY	600.13	768 4096	6601.2 6613.8	30	48	1024 4096
TOCSY	600.13	768 4096	6601.2 6613.8	50	40	1024 4096
TOCSY	600.13	768 4096	7201.4 7183.9	70	48	1024 4096
NOESY	600.13	768 4096	7201.4 7183.9	100	32	1024 8192
NOESY	800.13	876 4096	8771.9 8802.8	150	32	1024 8192

Zur Berechnung der Strukturen wurde das Programm X-PLOR (Version 98.1) von A. Brünger mit Modifikationen und Protokollen von M. Nilges, EMBL, Heidelberg, verwendet. Für die Auswertung der Strukturen und Anfertigung der Abbildungen wur-

den die Programme MOLMOL, Version 2.6, von R. Koradi, AQUA und PROCHECK-NMR von R. Laskowski verwendet.

7.6.2 NOE-restraints

assign	(resi	1 and	name	HB2)	(resi	1 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	1 and	name	HB1)	(resi	1 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	1 and	name	HG1)	(resi	1 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	1 and	name	HG1)	(resi	1 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	1 and	name	HG1)	(resi	1 and	name	HB2)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	1 and	name	HT*)	(resi	1 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	1 and	name	HT*)	(resi	1 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	1 and	name	HT*)	(resi	2 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	2 and	name	HB1)	(resi	2 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	2 and	name	HB1)	(resi	2 and	name	HB2)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	2 and	name	HB2)	(resi	2 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	2 and	name	HB2)	(resi	2 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	2 and	name	HN)	(resi	1 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	2 and	name	HN)	(resi	1 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	2 and	name	HN)	(resi	2 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	2 and	name	HN)	(resi	2 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	2 and	name	HN)	(resi	2 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	2 and	name	HN)	(resi	3 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	3 and	name	HD*)	(resi	3 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	3 and	name	HB2)	(resi	3 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	3 and	name	HB1)	(resi	3 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	3 and	name	HN)	(resi	1 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	3 and	name	HN)	(resi	2 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	3 and	name	HN)	(resi	2 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	3 and	name	HN)	(resi	2 and	name	HB2)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	3 and	name	HN)	(resi	3 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	3 and	name	HN)	(resi	3 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	3 and	name	HN)	(resi	3 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	3 and	name	HN)	(resi	3 and	name	HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	3 and	name	HN)	(resi	4 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	3 and	name	HN)	(resi	5 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	4 and	name	HB)	(resi	4 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	4 and	name	HG1*)	(resi	1 and	name	HA)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	4 and	name	HG1*)	(resi	4 and	name	HA)	5.50	5.00	0.00
assign	(resi	4 and	name	HG1*)	(resi	4 and	name	HB)	5.50	5.00	0.00
assign	(resi	4 and	name	HG2*)	(resi	1 and	name	HA)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	4 and	name	HG2*)	(resi	4 and	name	HA)	5.50	4.00	0.00
assign	(resi	4 and	name	HG2*)	(resi	4 and	name	HB)	5.50	4.00	0.00
assign	(resi	4 and	name	HN)	(resi	1 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	4 and	name	HN)	(resi	3 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	4 and	name	HN)	(resi	3 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	4 and	name	HN)	(resi	4 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	4 and	name	HN)	(resi	4 and	name	HB)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	4 and	name	HA)	(resi	4 and	name	HB)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	4 and	name	HN)	(resi	4 and	name	HG1*)	5.50	4.00	0.00
assign	(resi	4 and	name	HN)	(resi	4 and	name	HG2*)	6.50	5.00	0.00
assign	(resi	4 and	name	HN)	(resi	5 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	5 and	name	HB*)	(resi	2 and	name	HA)	5.90	5.00	0.00
assign	(resi	5 and	name	HB*)	(resi	5 and	name	HG2)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	5 and	name	HE21)	(resi	5 and	name	HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	5 and	name	HE22)	(resi	5 and	name	HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	5 and	name	HG1)	(resi	5 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00

assign	(resi	5 and	name	HG2)	(resi	5 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	5 and	name	HG2)	(resi	5 and	name	HG1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	2 and	name	HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	1 and	name	HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	3 and	name	HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	4 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	4 and	name	HG1*)	6.50	5.00	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	4 and	name	HG2*)	6.50	5.00	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	5 and	name	HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	5 and	name	HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	5 and	name	HB*)	4.90	3.50	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	5 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	5 and	name	HN)	(resi	6 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	6 and	name	HB*)	(resi	6 and	name	HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	9 and	name	HB1)	(resi	6 and	name	HA)	4.00	3.70	0.00
assign	(resi	6 and	name	HD*)	(resi	6 and	name	HA)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	6 and	name	HD*)	(resi	6 and	name	HB*)	7.40	6.90	0.00
assign	(resi	6 and	name	HD*)	(resi	6 and	name	HE*)	8.20	7.70	0.00
assign	(resi	6 and	name	HN)	(resi	5 and	name	HB*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	6 and	name	HN)	(resi	6 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	6 and	name	HN)	(resi	6 and	name	HB*)	3.70	3.60	0.00
assign	(resi	7 and	name	HB1)	(resi	7 and	name	HB2)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	7 and	name	HA)	(resi	7 and	name	HB1)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	7 and	name	HD*)	(resi	7 and	name	HA)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	7 and	name	HD*)	(resi	7 and	name	HB2)	4.90	4.80	0.00
assign	(resi	7 and	name	HN)	(resi	4 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	7 and	name	HN)	(resi	6 and	name	HB*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	7 and	name	HN)	(resi	6 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	7 and	name	HN)	(resi	7 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	7 and	name	HN)	(resi	7 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	7 and	name	HN)	(resi	7 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	7 and	name	HN)	(resi	6 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	7 and	name	HN)	(resi	3 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	7 and	name	HN)	(resi	8 and	name	HN)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	8 and	name	HA)	(resi	8 and	name	HB)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	8 and	name	HA)	(resi	11 and	name	HB*)	4.30	4.20	0.00
assign	(resi	8 and	name	HG2*)	(resi	8 and	name	HA)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	8 and	name	HG2*)	(resi	8 and	name	HB)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	8 and	name	HN)	(resi	4 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	8 and	name	HN)	(resi	5 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	8 and	name	HN)	(resi	7 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	8 and	name	HN)	(resi	7 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	8 and	name	HN)	(resi	8 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	8 and	name	HN)	(resi	8 and	name	HB)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	8 and	name	HN)	(resi	8 and	name	HG2*)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	8 and	name	HN)	(resi	9 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	9 and	name	HB1)	(resi	9 and	name	HD*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	9 and	name	HB2)	(resi	9 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	9 and	name	HB1)	(resi	9 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	9 and	name	HB2)	(resi	9 and	name	HD*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	9 and	name	HE)	(resi	9 and	name	HD*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	9 and	name	HE)	(resi	9 and	name	HG*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	9 and	name	HG*)	(resi	9 and	name	HD*)	5.80	4.50	0.00
assign	(resi	9 and	name	HG*)	(resi	9 and	name	HA)	4.90	4.50	0.00
assign	(resi	9 and	name	HN)	(resi	6 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	9 and	name	HN)	(resi	8 and	name	HB)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	9 and	name	HN)	(resi	8 and	name	HG2*)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	9 and	name	HN)	(resi	9 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	9 and	name	HN)	(resi	9 and	name	HB2)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	9 and	name	HN)	(resi	9 and	name	HG*)	4.90	4.00	0.00

assign	(resi	9 and	name HN)	(resi	10 and	name HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	10 and	name HB1)	(resi	10 and	name HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	10 and	name HB2)	(resi	10 and	name HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	10 and	name HB2)	(resi	10 and	name HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	10 and	name HN)	(resi	10 and	name HB2)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	10 and	name HN)	(resi	10 and	name HA)	2.80	2.80	0.00
assign	(resi	10 and	name HN)	(resi	6 and	name HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	11 and	name HB*)	(resi	11 and	name HA)	4.30	3.70	0.00
assign	(resi	11 and	name HN)	(resi	8 and	name HB)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	11 and	name HN)	(resi	8 and	name HG2*)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	11 and	name HN)	(resi	11 and	name HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	11 and	name HN)	(resi	10 and	name HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	11 and	name HN)	(resi	8 and	name HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	11 and	name HN)	(resi	11 and	name HB*)	5.50	5.50	0.00
assign	(resi	11 and	name HN)	(resi	10 and	name HB2)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	12 and	name HB)	(resi	12 and	name HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	12 and	name HB)	(resi	9 and	name HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	12 and	name HG1*)	(resi	12 and	name HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	12 and	name HN)	(resi	12 and	name HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	12 and	name HN)	(resi	9 and	name HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	12 and	name HN)	(resi	12 and	name HB)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	12 and	name HN)	(resi	12 and	name HG1*)	4.90	4.50	0.00
assign	(resi	12 and	name HN)	(resi	13 and	name HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	13 and	name HB*)	(resi	13 and	name HD1)	4.90	3.70	0.00
assign	(resi	13 and	name HE)	(resi	13 and	name HD1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	13 and	name HE)	(resi	13 and	name HD2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	13 and	name HE)	(resi	13 and	name HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	13 and	name HE)	(resi	13 and	name HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	13 and	name HG1)	(resi	13 and	name HD1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	13 and	name HN)	(resi	9 and	name HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	13 and	name HN)	(resi	10 and	name HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	13 and	name HN)	(resi	12 and	name HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	13 and	name HN)	(resi	13 and	name HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	13 and	name HN)	(resi	13 and	name HB*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	13 and	name HN)	(resi	14 and	name HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	14 and	name HA)	(resi	17 and	name HB)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	14 and	name HA)	(resi	14 and	name HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	14 and	name HA)	(resi	14 and	name HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	14 and	name HB*)	(resi	14 and	name HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	14 and	name HD*)	(resi	14 and	name HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	14 and	name HD*)	(resi	14 and	name HB*)	4.60	3.70	0.00
assign	(resi	14 and	name HD*)	(resi	14 and	name HG1)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	14 and	name HD*)	(resi	14 and	name HG2)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	14 and	name HE)	(resi	14 and	name HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	14 and	name HE)	(resi	14 and	name HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	14 and	name HG2)	(resi	14 and	name HD*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	14 and	name HN)	(resi	12 and	name HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	14 and	name HN)	(resi	13 and	name HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	14 and	name HN)	(resi	14 and	name HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	14 and	name HN)	(resi	14 and	name HB*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	14 and	name HN)	(resi	14 and	name HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	15 and	name HB*)	(resi	15 and	name HA)	4.30	3.80	0.00
assign	(resi	15 and	name HN)	(resi	12 and	name HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	15 and	name HN)	(resi	15 and	name HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	15 and	name HN)	(resi	15 and	name HB*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	15 and	name HN)	(resi	16 and	name HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	15 and	name HN)	(resi	17 and	name HN)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	16 and	name HB1)	(resi	16 and	name HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	16 and	name HB2)	(resi	16 and	name HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	16 and	name HB2)	(resi	16 and	name HB1)	2.80	2.50	0.00

assign	(resi	16 and	name	HN)	(resi	12 and	name	HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	16 and	name	HN)	(resi	13 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	16 and	name	HN)	(resi	15 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	16 and	name	HN)	(resi	15 and	name	HB*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	16 and	name	HN)	(resi	16 and	name	HB2)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	16 and	name	HN)	(resi	15 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	16 and	name	HN)	(resi	16 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	16 and	name	HN)	(resi	16 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	16 and	name	HN)	(resi	17 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	17 and	name	HA)	(resi	17 and	name	HB)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	17 and	name	HG2*)	(resi	17 and	name	HA)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	17 and	name	HG2*)	(resi	17 and	name	HB)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	17 and	name	HN)	(resi	16 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	17 and	name	HN)	(resi	16 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	17 and	name	HN)	(resi	16 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	17 and	name	HN)	(resi	17 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	17 and	name	HN)	(resi	13 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	17 and	name	HN)	(resi	17 and	name	HB)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	17 and	name	HN)	(resi	17 and	name	HG2*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	17 and	name	HN)	(resi	16 and	name	HB2)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	17 and	name	HN)	(resi	18 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	18 and	name	HB)	(resi	18 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	18 and	name	HD*)	(resi	18 and	name	HA)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	18 and	name	HG1*)	(resi	18 and	name	HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	18 and	name	HG2*)	(resi	18 and	name	HA)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	18 and	name	HN)	(resi	17 and	name	HB)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	18 and	name	HN)	(resi	17 and	name	HG2*)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	18 and	name	HN)	(resi	17 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	18 and	name	HN)	(resi	18 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	18 and	name	HN)	(resi	18 and	name	HB)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	18 and	name	HN)	(resi	18 and	name	HD*)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	18 and	name	HN)	(resi	18 and	name	HG1*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	18 and	name	HN)	(resi	18 and	name	HG2*)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	18 and	name	HN)	(resi	19 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	19 and	name	HB2)	(resi	19 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	19 and	name	HB1)	(resi	19 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	19 and	name	HG*)	(resi	19 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	19 and	name	HN)	(resi	16 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	19 and	name	HN)	(resi	18 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	19 and	name	HN)	(resi	19 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	19 and	name	HN)	(resi	18 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	19 and	name	HN)	(resi	15 and	name	HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	19 and	name	HN)	(resi	19 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	19 and	name	HN)	(resi	19 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	19 and	name	HN)	(resi	19 and	name	HG*)	4.90	3.50	0.00
assign	(resi	19 and	name	HN)	(resi	21 and	name	HD*)	5.90	5.00	0.00
assign	(resi	20 and	name	HB1)	(resi	20 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HB1)	(resi	20 and	name	HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HB2)	(resi	20 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HB2)	(resi	20 and	name	HG1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HG1)	(resi	20 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HG2)	(resi	20 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HG2)	(resi	20 and	name	HG1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HG2)	(resi	21 and	name	HD*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	20 and	name	HN)	(resi	17 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HN)	(resi	18 and	name	HN)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	20 and	name	HN)	(resi	19 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HN)	(resi	20 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HN)	(resi	20 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HN)	(resi	20 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00

assign	(resi	20 and	name	HN)	(resi	20 and	name	HG1)	5.00	4.50	0.00
assign	(resi	20 and	name	HN)	(resi	21 and	name	HD*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	21 and	name	HB1)	(resi	21 and	name	HD*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	21 and	name	HB2)	(resi	21 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	21 and	name	HB1)	(resi	21 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	21 and	name	HB2)	(resi	21 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	21 and	name	HB2)	(resi	21 and	name	HD*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	21 and	name	HD*)	(resi	20 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	21 and	name	HD*)	(resi	17 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	21 and	name	HD*)	(resi	18 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	21 and	name	HD*)	(resi	20 and	name	HB1)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	21 and	name	HD*)	(resi	20 and	name	HB2)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	21 and	name	HD*)	(resi	21 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	21 and	name	HG1)	(resi	21 and	name	HD*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	21 and	name	HG2)	(resi	21 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	21 and	name	HG2)	(resi	21 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	21 and	name	HG2)	(resi	21 and	name	HD*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	22 and	name	HB1)	(resi	22 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HB2)	(resi	22 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HE22)	(resi	22 and	name	HE21)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HE22)	(resi	22 and	name	HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HE22)	(resi	22 and	name	HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HG1)	(resi	22 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HN)	(resi	21 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HN)	(resi	21 and	name	HD*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	22 and	name	HN)	(resi	22 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HN)	(resi	22 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HN)	(resi	22 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HN)	(resi	22 and	name	HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	22 and	name	HN)	(resi	23 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	23 and	name	HB1)	(resi	23 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	23 and	name	HB2)	(resi	23 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	23 and	name	HG*)	(resi	23 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	23 and	name	HN)	(resi	20 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	23 and	name	HN)	(resi	22 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	23 and	name	HN)	(resi	22 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	23 and	name	HN)	(resi	23 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	23 and	name	HN)	(resi	23 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	23 and	name	HN)	(resi	23 and	name	HB2)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	23 and	name	HN)	(resi	23 and	name	HG*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	23 and	name	HN)	(resi	24 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	23 and	name	HN)	(resi	25 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	24 and	name	HB*)	(resi	20 and	name	HA)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	24 and	name	HB*)	(resi	21 and	name	HA)	7.00	6.50	0.00
assign	(resi	24 and	name	HB*)	(resi	24 and	name	HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	24 and	name	HN)	(resi	20 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	24 and	name	HN)	(resi	23 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	24 and	name	HN)	(resi	24 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	24 and	name	HN)	(resi	24 and	name	HB*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	25 and	name	HB1)	(resi	22 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	25 and	name	HB1)	(resi	25 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	25 and	name	HB2)	(resi	22 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	25 and	name	HB2)	(resi	25 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	25 and	name	HE)	(resi	25 and	name	HG1)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	25 and	name	HE)	(resi	25 and	name	HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	25 and	name	HG1)	(resi	25 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	25 and	name	HG1)	(resi	25 and	name	HD*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	25 and	name	HG2)	(resi	25 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	25 and	name	HN)	(resi	21 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	25 and	name	HN)	(resi	22 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00

assign	(resi	25 and	name	HN)	(resi	24 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	25 and	name	HN)	(resi	24 and	name	HB*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	25 and	name	HN)	(resi	25 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	25 and	name	HN)	(resi	25 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	25 and	name	HN)	(resi	25 and	name	HB2)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	26 and	name	HB1)	(resi	26 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	26 and	name	HB1)	(resi	23 and	name	HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	26 and	name	HB2)	(resi	23 and	name	HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	26 and	name	HB2)	(resi	26 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	26 and	name	HE21)	(resi	26 and	name	HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	26 and	name	HE22)	(resi	26 and	name	HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	26 and	name	HG1)	(resi	26 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	26 and	name	HG2)	(resi	26 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	26 and	name	HN)	(resi	23 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	26 and	name	HN)	(resi	26 and	name	HA)	2.80	2.80	0.00
assign	(resi	26 and	name	HN)	(resi	25 and	name	HB1)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	26 and	name	HN)	(resi	26 and	name	HB2)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	26 and	name	HN)	(resi	26 and	name	HG2)	5.00	4.50	0.00
assign	(resi	26 and	name	HN)	(resi	26 and	name	HG1)	5.00	4.50	0.00
assign	(resi	26 and	name	HN)	(resi	27 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HB1)	(resi	24 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	27 and	name	HB2)	(resi	24 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HB2)	(resi	27 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HB2)	(resi	27 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HD21)	(resi	27 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HD21)	(resi	27 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HD22)	(resi	27 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HD22)	(resi	27 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HD22)	(resi	27 and	name	HD21)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HN)	(resi	23 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HN)	(resi	24 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HN)	(resi	26 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HN)	(resi	26 and	name	HG1)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	27 and	name	HN)	(resi	26 and	name	HG2)	5.00	4.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HN)	(resi	27 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HN)	(resi	27 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HA)	(resi	27 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	27 and	name	HN)	(resi	27 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	27 and	name	HN)	(resi	28 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	28 and	name	HD*)	(resi	28 and	name	HA)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	28 and	name	HB1)	(resi	28 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	28 and	name	HB2)	(resi	28 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	28 and	name	HD*)	(resi	28 and	name	HB2)	4.90	4.60	0.00
assign	(resi	28 and	name	HN)	(resi	24 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	28 and	name	HN)	(resi	25 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	28 and	name	HN)	(resi	27 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	28 and	name	HN)	(resi	28 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	28 and	name	HN)	(resi	28 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	28 and	name	HN)	(resi	28 and	name	HB2)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	28 and	name	HN)	(resi	29 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	29 and	name	HB1)	(resi	29 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	29 and	name	HB2)	(resi	29 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	29 and	name	HE21)	(resi	29 and	name	HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	29 and	name	HE22)	(resi	29 and	name	HE21)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	29 and	name	HE22)	(resi	29 and	name	HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	29 and	name	HG1)	(resi	29 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	29 and	name	HG2)	(resi	29 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	27 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	26 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	28 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00

assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	28 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	28 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	28 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	29 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	29 and	name	HB1)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	29 and	name	HB2)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	29 and	name	HG1)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	29 and	name	HN)	(resi	29 and	name	HG2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HB2)	(resi	30 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HB2)	(resi	30 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HD21)	(resi	30 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HD21)	(resi	30 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HD22)	(resi	30 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HD22)	(resi	30 and	name	HD21)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HN)	(resi	29 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HN)	(resi	29 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HN)	(resi	30 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HN)	(resi	30 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	30 and	name	HN)	(resi	30 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	30 and	name	HB1)	(resi	30 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	31 and	name	HB1)	(resi	31 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	31 and	name	HB2)	(resi	31 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	31 and	name	HD*)	(resi	31 and	name	HA)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	31 and	name	HN)	(resi	30 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	31 and	name	HN)	(resi	31 and	name	HA)	2.80	2.80	0.00
assign	(resi	31 and	name	HN)	(resi	28 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	31 and	name	HN)	(resi	30 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	31 and	name	HN)	(resi	30 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	31 and	name	HN)	(resi	30 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	31 and	name	HN)	(resi	31 and	name	HB1)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	31 and	name	HN)	(resi	31 and	name	HB2)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	31 and	name	HN)	(resi	32 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	32 and	name	HB*)	(resi	29 and	name	HA)	3.70	3.70	0.00
assign	(resi	32 and	name	HB*)	(resi	32 and	name	HA)	4.90	3.70	0.00
assign	(resi	32 and	name	HN)	(resi	32 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	32 and	name	HD*)	(resi	32 and	name	HA)	6.50	5.50	0.00
assign	(resi	32 and	name	HN)	(resi	30 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	32 and	name	HN)	(resi	29 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	32 and	name	HN)	(resi	31 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	32 and	name	HN)	(resi	31 and	name	HD*)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	32 and	name	HN)	(resi	31 and	name	HG)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	32 and	name	HN)	(resi	32 and	name	HB*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	32 and	name	HN)	(resi	32 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	32 and	name	HN)	(resi	33 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HB)	(resi	30 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HB)	(resi	33 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HD*)	(resi	33 and	name	HA)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HD*)	(resi	33 and	name	HB)	4.00	2.80	0.00
assign	(resi	33 and	name	HG1*)	(resi	33 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	33 and	name	HG2*)	(resi	33 and	name	HB)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HG2*)	(resi	33 and	name	HA)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HN)	(resi	30 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HN)	(resi	32 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HN)	(resi	32 and	name	HB*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	33 and	name	HN)	(resi	32 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HN)	(resi	33 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HN)	(resi	33 and	name	HB)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HN)	(resi	33 and	name	HG2*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	33 and	name	HN)	(resi	34 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HB1)	(resi	31 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00

assign	(resi	34 and	name	HB1)	(resi	34 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HB2)	(resi	31 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HB2)	(resi	34 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HB2)	(resi	34 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HD21)	(resi	34 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HD22)	(resi	34 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HD22)	(resi	34 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HD22)	(resi	34 and	name	HD21)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HN)	(resi	30 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HN)	(resi	34 and	name	HA)	2.80	2.80	0.00
assign	(resi	34 and	name	HN)	(resi	33 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HN)	(resi	34 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HN)	(resi	34 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	34 and	name	HN)	(resi	35 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	35 and	name	HB*)	(resi	32 and	name	HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	35 and	name	HB*)	(resi	35 and	name	HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	35 and	name	HD*)	(resi	32 and	name	HA)	7.50	7.50	0.00
assign	(resi	35 and	name	HD*)	(resi	35 and	name	HA)	6.50	6.50	0.00
assign	(resi	35 and	name	HD*)	(resi	35 and	name	HB*)	7.40	6.90	0.00
assign	(resi	35 and	name	HN)	(resi	31 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	35 and	name	HN)	(resi	32 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	35 and	name	HN)	(resi	34 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	35 and	name	HN)	(resi	34 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	35 and	name	HN)	(resi	34 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	35 and	name	HN)	(resi	35 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	35 and	name	HN)	(resi	35 and	name	HB*)	4.90	4.50	0.00
assign	(resi	35 and	name	HN)	(resi	36 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	36 and	name	HB1)	(resi	33 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	36 and	name	HB1)	(resi	36 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	36 and	name	HB2)	(resi	33 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	36 and	name	HB2)	(resi	36 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	36 and	name	HB2)	(resi	36 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	36 and	name	HN)	(resi	35 and	name	HB*)	4.90	2.80	0.00
assign	(resi	36 and	name	HN)	(resi	36 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	36 and	name	HN)	(resi	36 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	36 and	name	HN)	(resi	36 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	37 and	name	HB*)	(resi	37 and	name	HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	37 and	name	HD1*)	(resi	37 and	name	HA)	4.30	4.20	0.00
assign	(resi	37 and	name	HD1*)	(resi	37 and	name	HG)	4.30	4.20	0.00
assign	(resi	37 and	name	HD2*)	(resi	37 and	name	HA)	4.30	4.20	0.00
assign	(resi	37 and	name	HD2*)	(resi	37 and	name	HG)	5.50	5.50	0.00
assign	(resi	37 and	name	HG)	(resi	37 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	37 and	name	HN)	(resi	37 and	name	HB*)	3.70	3.60	0.00
assign	(resi	37 and	name	HN)	(resi	37 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	37 and	name	HN)	(resi	34 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	37 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	37 and	name	HN)	(resi	39 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	38 and	name	HB)	(resi	35 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	38 and	name	HB)	(resi	38 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	38 and	name	HD*)	(resi	38 and	name	HA)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	38 and	name	HG1*)	(resi	38 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	34 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	35 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	36 and	name	HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	37 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	37 and	name	HG)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	37 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HB)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HD*)	5.50	4.50	0.00

assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HG1*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HG2*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	38 and	name	HN)	(resi	39 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	39 and	name	HB*)	(resi	36 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	39 and	name	HD*)	(resi	39 and	name	HA)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	39 and	name	HD*)	(resi	39 and	name	HB*)	8.00	8.00	0.00
assign	(resi	39 and	name	HD*)	(resi	39 and	name	HG)	6.10	4.50	0.00
assign	(resi	39 and	name	HA)	(resi	39 and	name	HG)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	35 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	36 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HB)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HG1*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HG2*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	39 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	39 and	name	HB*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	39 and	name	HA)	(resi	39 and	name	HB*)	3.70	3.60	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	39 and	name	HD*)	7.10	7.00	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	39 and	name	HG)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	39 and	name	HN)	(resi	40 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	40 and	name	HG2*)	(resi	40 and	name	HA)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	40 and	name	HN)	(resi	39 and	name	HG)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	40 and	name	HN)	(resi	39 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	40 and	name	HN)	(resi	40 and	name	HG2*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	40 and	name	HA)	(resi	40 and	name	HG1*)	4.30	4.20	0.00
assign	(resi	40 and	name	HN)	(resi	40 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	40 and	name	HB)	(resi	40 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	40 and	name	HN)	(resi	40 and	name	HB)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	40 and	name	HN)	(resi	41 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	41 and	name	HB*)	(resi	38 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	41 and	name	HB*)	(resi	41 and	name	HA)	3.70	3.00	0.00
assign	(resi	41 and	name	HD*)	(resi	41 and	name	HA)	6.50	5.50	0.00
assign	(resi	41 and	name	HN)	(resi	37 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	41 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	41 and	name	HN)	(resi	41 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	41 and	name	HN)	(resi	40 and	name	HB)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	41 and	name	HN)	(resi	40 and	name	HG2*)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	41 and	name	HN)	(resi	41 and	name	HB*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	41 and	name	HN)	(resi	42 and	name	HN)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	42 and	name	HB*)	(resi	42 and	name	HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	42 and	name	HD*)	(resi	42 and	name	HA)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	42 and	name	HG)	(resi	42 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	42 and	name	HN)	(resi	38 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	42 and	name	HN)	(resi	41 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	42 and	name	HN)	(resi	41 and	name	HB*)	5.90	5.50	0.00
assign	(resi	42 and	name	HN)	(resi	42 and	name	HD*)	7.10	7.00	0.00
assign	(resi	42 and	name	HN)	(resi	42 and	name	HB*)	4.90	4.90	0.00
assign	(resi	42 and	name	HN)	(resi	42 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	42 and	name	HN)	(resi	42 and	name	HG)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	42 and	name	HN)	(resi	43 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	43 and	name	HB*)	(resi	43 and	name	HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	43 and	name	HD*)	(resi	43 and	name	HA)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	43 and	name	HN)	(resi	40 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	43 and	name	HN)	(resi	42 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	43 and	name	HN)	(resi	42 and	name	HB*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	43 and	name	HN)	(resi	43 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	44 and	name	HB*)	(resi	41 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	44 and	name	HD*)	(resi	44 and	name	HA)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	44 and	name	HN)	(resi	41 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00

assign	(resi	44 and	name	HN)	(resi	44 and	name	HB*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	44 and	name	HA)	(resi	44 and	name	HB*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	44 and	name	HA)	(resi	44 and	name	HG)	4.00	3.70	0.00
assign	(resi	44 and	name	HN)	(resi	44 and	name	HD*)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	44 and	name	HN)	(resi	44 and	name	HG)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	44 and	name	HN)	(resi	44 and	name	HA)	2.80	2.80	0.00
assign	(resi	44 and	name	HN)	(resi	43 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HD*)	(resi	45 and	name	HA)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	45 and	name	HD*)	(resi	45 and	name	HB)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	45 and	name	HD*)	(resi	45 and	name	HG11)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	45 and	name	HD*)	(resi	45 and	name	HG12)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	45 and	name	HD*)	(resi	45 and	name	HG2*)	6.40	5.50	0.00
assign	(resi	45 and	name	HG12)	(resi	45 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HG2*)	(resi	45 and	name	HB)	4.00	3.70	0.00
assign	(resi	45 and	name	HG2*)	(resi	45 and	name	HA)	4.30	4.20	0.00
assign	(resi	45 and	name	HG2*)	(resi	45 and	name	HG11)	5.50	5.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	41 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	44 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	42 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	44 and	name	HB*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	44 and	name	HG)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	45 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	45 and	name	HB)	(resi	45 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	45 and	name	HB)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	45 and	name	HG11)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HA)	(resi	45 and	name	HG11)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	45 and	name	HG12)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	45 and	name	HG2*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	45 and	name	HN)	(resi	46 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HB1)	(resi	43 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	46 and	name	HB1)	(resi	46 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HB2)	(resi	43 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HB2)	(resi	46 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HB2)	(resi	46 and	name	HB1)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HN)	(resi	43 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HN)	(resi	45 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HN)	(resi	45 and	name	HB)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	46 and	name	HN)	(resi	45 and	name	HG2*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HN)	(resi	45 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HN)	(resi	46 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HN)	(resi	46 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HN)	(resi	46 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	46 and	name	HN)	(resi	47 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	47 and	name	HG1*)	(resi	47 and	name	HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	47 and	name	HG2*)	(resi	47 and	name	HA)	4.30	3.70	0.00
assign	(resi	47 and	name	HN)	(resi	46 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	47 and	name	HN)	(resi	46 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	47 and	name	HN)	(resi	47 and	name	HB)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	47 and	name	HN)	(resi	47 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	47 and	name	HN)	(resi	44 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	47 and	name	HN)	(resi	46 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	47 and	name	HN)	(resi	47 and	name	HG1*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	47 and	name	HN)	(resi	47 and	name	HG2*)	4.30	4.20	0.00
assign	(resi	48 and	name	HN)	(resi	48 and	name	HG1*)	4.90	4.90	0.00
assign	(resi	48 and	name	HA)	(resi	48 and	name	HG1*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	48 and	name	HA)	(resi	48 and	name	HD*)	5.50	5.50	0.00
assign	(resi	48 and	name	HN)	(resi	48 and	name	HG2*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	48 and	name	HN)	(resi	48 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	48 and	name	HB)	(resi	48 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	48 and	name	HN)	(resi	48 and	name	HB)	4.00	3.50	0.00

assign	(resi	48 and	name	HN)	(resi	50 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	49 and	name	HB)	(resi	46 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	49 and	name	HB)	(resi	49 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	49 and	name	HG1*)	(resi	49 and	name	HA)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	49 and	name	HG1*)	(resi	49 and	name	HB)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	49 and	name	HG2*)	(resi	49 and	name	HA)	4.30	3.70	0.00
assign	(resi	49 and	name	HG2*)	(resi	49 and	name	HB)	4.30	3.70	0.00
assign	(resi	49 and	name	HN)	(resi	46 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	49 and	name	HN)	(resi	48 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	49 and	name	HN)	(resi	45 and	name	HA)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	49 and	name	HN)	(resi	48 and	name	HB)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	49 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	49 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HB)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	49 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HG1*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	49 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HG2*)	5.50	4.50	0.00
assign	(resi	49 and	name	HN)	(resi	50 and	name	HN)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HB1)	(resi	50 and	name	HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HB2)	(resi	50 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HB1)	(resi	50 and	name	HA)	2.80	2.70	0.00
assign	(resi	50 and	name	HG2)	(resi	50 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	46 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	47 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HB)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HG1*)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HG2*)	6.50	6.00	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HN)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	50 and	name	HA)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	50 and	name	HB1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	50 and	name	HB2)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	50 and	name	HG1)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	50 and	name	HG2)	5.00	5.00	0.00
assign	(resi	50 and	name	HN)	(resi	51 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	51 and	name	HB*)	(resi	51 and	name	HA)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	51 and	name	HD*)	(resi	51 and	name	HA)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	51 and	name	HG)	(resi	51 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	51 and	name	HN)	(resi	48 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	51 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	51 and	name	HN)	(resi	51 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	51 and	name	HN)	(resi	51 and	name	HB*)	4.90	4.00	0.00
assign	(resi	51 and	name	HN)	(resi	51 and	name	HD*)	7.10	7.00	0.00
assign	(resi	51 and	name	HN)	(resi	51 and	name	HG)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	51 and	name	HN)	(resi	52 and	name	HN)	2.80	2.50	0.00
assign	(resi	52 and	name	HB*)	(resi	52 and	name	HA)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	52 and	name	HD*)	(resi	52 and	name	HA)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	52 and	name	HG)	(resi	52 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	52 and	name	HN)	(resi	52 and	name	HA)	4.00	3.50	0.00
assign	(resi	52 and	name	HN)	(resi	49 and	name	HA)	4.00	4.00	0.00
assign	(resi	52 and	name	HN)	(resi	52 and	name	HB*)	3.70	2.80	0.00
assign	(resi	52 and	name	HN)	(resi	52 and	name	HD*)	6.10	5.50	0.00
assign	(resi	52 and	name	HN)	(resi	52 and	name	HG)	4.00	3.50	0.00

7.6.3 Dihedralwinkel-restraints

assign (resid 1 and name C) (resid 2 and name N)
 (resid 2 and name CA) (resid 2 and name C) 1.0 -143.00 25.0 2
 assign (resid 51 and name C) (resid 52 and name N)
 (resid 52 and name CA) (resid 52 and name C) 1.0 -120.00 25.0 2
 assign (resid 50 and name C) (resid 51 and name N)
 (resid 51 and name CA) (resid 51 and name C) 1.0 -119.00 25.0 2

```

assign (resid 17 and name C) (resid 18 and name N)
(resid 18 and name CA) (resid 18 and name C) 1.0 -120.00 25.0 2
assign (resid 16 and name C) (resid 17 and name N)
(resid 17 and name CA) (resid 17 and name C) 1.0 -154.00 25.0 2

```

7.6.4 Protokolle der Strukturberechnung von Phospholamban

7.6.4.1 Simulated Annealing Protokol (plb.inp)

```

remarks plb.inp
remarks Author: Michael Nilges

evaluate ($ini_count = 0)
evaluate ($end_count = 100)

evaluate ($iniseed = 283745) { * changed from 567313 * }

evaluate ($init_t = 2000 ) { * initial simulated annealing temperature * }
evaluate ($high_steps = 6500)
evaluate ($cool1_steps = 5000) { increased from 2500 }
evaluate ($cool2_steps = 2000) { increased from 1000 }
evaluate ($final1_t = 1000) { K }
evaluate ($final2_t = 100) { K }
evaluate ($tempstep = 50) { K }

evaluate ($fileroot = "ps/plb_1/plb_1_")
evaluate ($reference = "pi/phola_template.pdb")
evaluate ($template = "pi/phola_template.pdb")

structure @@pi/phola.psf end
parameter @@pi/parallhdg.pro end

parameter
  bond (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
  angle (all) (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
end

@@pi/read_aldata.xplor

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih dihe end

vector do (fbeta=10) (all) { * friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps * }
vector do (mass=100) (all)

evaluate ($kcdih = 5)
restraints dihedral
  scale=$kcdih { * initial weight - will be modified later * }
end

evaluate ($count = $ini_count)
while ($count < $end_count ) loop main

  evaluate ($count=$count+1)
  evaluate ($nreassign = 0)
  coor @@ $template
  evaluate ($seed = $count*$iniseed)
  set seed $seed end
@pi/sa_1_randomchain.xplor
  evaluate ($cpu1 = $cpu)

```

```

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool_steps/$ncycle))

@pi/setup_swapnew.xplor
vector ident (store2) (store1)
parameter
  improper (store2) (store2) (all) (all) 0.0 TOKEN TOKEN
  improper (all) (all) (store2) (store2) 0.0 TOKEN TOKEN
end

@@pi/sa_1_initial_values.xplor
parameter
  angle (store2) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
  angle (all) (all) (store2) $ini_flt TOKEN
end

parameter nbonds
  atom cutnb 12 tolerance 3.5 repel=1.2 wmin 0.5
  rexp=2 irexp=2 rcon=1. nbxmod 4
end end

@@pi/sa_1_reduced.xplor { defines store1 }

constraints
  interaction (all) (not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.0 elec 0 end
  interaction (store1) (store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.1 elec 0 end
end

{ * 1 ===== initial minimization *}
restraints dihedral scale=5. end
noe potential * soft scale * 1.0 asymptote * 2.0 end
minimize powell nstep=50 drop=10. nprint=25 end

{ * 2 ===== high temperature dynamics *}

@pi/sa_1_hightemp.xplor
{ * write coor sele= (name ca) output= high.pdb end *}

{ * 3 ===== cooling 1 *}

@pi/sa_1_cool1.xplor

{ * 4 ===== cooling 2 *}

@pi/sa_1_cool2.xplor

{ * 5 ===== final minimization *}

evaluate ($swap = 1.001)
flags exclude * include noe end
@pi/swap15v.xplor
flags include bond angl impr vdw noe cdih dihe end

minimize powell nstep=200 drop=10.0 nprint=25 end

```

```
{ * 6 ===== write out the final structure(s) * }
```

```
evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")
@pi/print_coorheader.xplor
write coordinates sele= (all) output =$filename end
```

```
end loop main
```

```
stop
```

7.6.4.2 Hochtemperaturphase (sa_1_hightemp.xplor)

```
evaluate ($nstep1=int($high_steps / 5.0 ) )
```

```
vector do (vx = maxwell($init_t)) (all)
vector do (vy = maxwell($init_t)) (all)
vector do (vz = maxwell($init_t)) (all)
```

```
for $knoe in (3.125 6.25 12.5 25 50) loop anne
  noe scale dist $knoe scale ambi $ini_amb scale hbon $ini_amb end
```

```
  flags exclude * include noe end
  evaluate ($swap = 1.001)
  @pi/swap15v.xplor
  flags include bond angl impr vdw noe cdih dihe end
```

```
  evaluate ($kvdw = $knoe * 0.002)
  constraints
    interaction (all) (not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.0 elec 0 end
    interaction (store1) (store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw $kvdw elec 0 end
  end
```

```
  dynamics verlet
    nstep=$nstep1 timestep=0.005 iasvel=current firstt=$init_t
    tcoupling=true tbath=$init_t nprint=50 iprfreq=0
    ntrfrq=9999
  end
```

```
  evaluate ($critical=$temp/$init_t)
  if ($critical > 1.2) then
    evaluate ($nreassign = $nreassign + 1)
    mini powell nstep 100 end
    vector do (vx=maxwell($init_t)) ( all )
    vector do (vy=maxwell($init_t)) ( all )
    vector do (vz=maxwell($init_t)) ( all )
  end if
end loop anne
```

7.6.4.3 Erste Abkühlphase (sa_1_cool1.xplor)

```
vector do (vx=maxwell($init_t)) ( all )
vector do (vy=maxwell($init_t)) ( all )
vector do (vz=maxwell($init_t)) ( all )
```

```
{ * 4 ===== cool the system * }
```

```
evaluate ($swap = 0.05)
```

```
restraints dihedral scale=200. end
```

```
parameter { * parameters for the repulsive energy term * }
```

```

nbonds
  repel=1.          { * initial value for repel - modified later *}
  rexp=2 irexp=2 rcon=1.
  nbxmod=3
  wmin=0.01
  cutnb=4.5 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
  tolerance=0.5
end
end

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool_steps/$ncycle))

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
  evaluate ($i_cool=$i_cool+1)

  evaluate ($bath = $bath - $tempstep)
  evaluate ($k_vdw=min($fin_con,$k_vdw*$k_vdwfact))
  evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius*$radfact))
  evaluate ($k_flt = $k_flt*$flt_fac)
  evaluate ($k_ang = $k_ang*$ang_fac)
  evaluate ($k_imp = $k_imp*$imp_fac)
  evaluate ($k_amb = $k_amb*$amb_fac)

  flags exclude * include noe end
  @pi/swap15v.xplor
  flags include bond angl impr vdw noe cdih dihe end

  parameter
!   bond (name sg) (name sg) $k_flt TOKEN
!   angle (all) (name sg) (name sg) $k_flt TOKEN
  angle (store2) (all) (store2) $k_flt TOKEN
  angle (all) (all) (store2) $k_flt TOKEN
  nbonds repel=$radius end
end

constraints
  interaction (all) (all) weights * 1 vdw $k_vdw end
end
noe scale dist $knoe scale ambi $k_amb scale hbond $k_amb end

dynamics verlet
  nstep=$nstep time=0.005 iasvel=current firstt=$bath
  tcoup=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfreq=0
  ntrfrq=99999
end

evaluate ($critical=$temp/$bath)
if ($critical > 1.2) then
  evaluate ($nreassign = $nreassign + 1)
  mini powell nstep 100 end
  vector do (vx=maxwell($bath)) ( all )
  vector do (vy=maxwell($bath)) ( all )
  vector do (vz=maxwell($bath)) ( all )
end if

end loop cool

```

7.6.4.4 Zweite Abkühlphase (sa_l_cool2.xplor)

constraints interaction (all) (all) weights * 1. vdw 4. end end

```
evaluate ($ncycle = ($bath-$final2_t)/$tempstep)
```

```
evaluate ($nstep = int($cool2_steps/$ncycle))
```

```
evaluate ($i_cool = 0)
```

```
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
```

```
  evaluate ($i_cool=$i_cool+1)
```

```
  evaluate ($bath = $bath - $tempstep)
```

```
flags exclude * include noe end
```

```
@pi/swap15v.xplor
```

```
flags include bond angl impr vdw noe cdih dihe end
```

```
dynamics verlet
```

```
  nstep=$nstep time=0.005 iasvel=current firstt=$bath
```

```
  tcoup=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfreq=0
```

```
  ntrfrq=9999
```

```
end
```

```
{====>} { * abort condition * }
```

```
  evaluate ($critical=$temp/$bath)
```

```
  if ($critical > 1.2) then
```

```
    evaluate ($nreassign = $nreassign + 1)
```

```
    mini powell nstep 100 end
```

```
    vector do (vx=maxwell($bath)) ( all )
```

```
    vector do (vy=maxwell($bath)) ( all )
```

```
    vector do (vz=maxwell($bath)) ( all )
```

```
  end if
```

```
end loop cool
```

7.7 Publikation

NMR Solution Structure of Phospholamban; Stefanie Lamberth, Holger Schmid, Martin Muenchbach, Thomas Vorherr, Joachim Krebs, Ernesto Carafoli and Christian Griesinger, *Helv. Chim. Acta*, (2000) **83**, 2141

8 Literaturverzeichnis

- [1] Hajduk, P. J., Meadows, R. P., Fesik, S. W.; *Science* (1997) **278**, 497
- [2] Reif, B., Hennig, M., Griesinger, C.; *Science* (1997) **276**, 1230
- [3] Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) **94**, 12366
- [4] Pettit, G., Kamano, Y., Herald, C., *et al.*; *Tetrahedron* (1993) **49**, 9151
- [5] Wright, J., Blatner, G., Cheson, B., *et al.*; *Oncology* (1999) **13**, 68
- [6] Pettit, G., Kamano, Y., Herald, C., *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* (1987) **109**, 6883
- [7] Pettit, G., Singh, S., Hogan, F., *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* (1989) **111**, 5463
- [8] Pettit, G., Kamano, Y., Dufresne, C., *et al.*; *J. Org. Chem.* (1989) **54**, 6005
- [9] Pettit, G., Herald, D., Singh, S., *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* (1991) **113**, 6692
- [10] Sone, H., Shibata, T., Fujita, T., *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* (1996) **118**, 1874
- [11] Harrigan, G., Luesch, H., Yoshida, W., *et al.*; *J. Nat. Prod.* (1998) **61**, 1075
- [12] Santavy, F., Reichstein, T.; *Helv. Chim. Acta* (1950) **33**, 1606
- [13] Malawista, S., Bensch, K.; *Science*, (1967) **156**, 521
- [14] Corrodi, H., Hardegger, E.; *Helv. Chim. Acta* (1955) **241**, 2030
- [15] Lettre, H.; *Z. Krebsforschung* (1950) **57**, 1
- [16] <http://cancernet.nci.nih.gov>
- [17] Voet, D., Voet, J.; *Biochemistry*, 2. Auflage, New York, John Wiley, (1995)

- [18] Nogales, E., Wolf, S., Downing, K.; *Nature* (1998) **391**, 199
- [19] Koolman, J., Röhm, K.; Taschenatlas der Biochemie, 2. Auflage, Stuttgart, Thieme-Verlage, (1998) S.372
- [20] Bai, R., Pettit, G., Hamel, E.; *Biochem. Pharmac.* (1990) **39**, 1941
- [21] Bai, R., Pettit, G., Hamel, E.; *J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 17141
- [22] Li, Y., Kobayashi, H., Hashimoto, Y., *et al.*; *Chem.-Biol. Int.* (1994) **93**, 175
- [23] Bai, R., Pettit, G., Hamel, E.; *Biochem. Pharmac.* (1990) **40**, 1859
- [24] Bai, R., Roach, M., Jayaram, S., *et al.*; *Biochem. Pharmac.* (1993) **45**, 1503
- [25] Weisenberg, R., Borisy, G., Taylor, E.; *Biochemistry* (1968) **7**, 4466
- [26] Garland, D.; *Biochemistry* (1978) **17**, 4266
- [27] Skoufias, D., Wilson, L.; *Biochemistry* (1992) **31**, 738
- [28] Banerjee, S., Chakrabarti, G., Bhattacharyya, B.; *Biochemistry* (1997) **36**, 5600
- [29] Uppuluri, S., Knipling, L., Sackett, D., *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) **90**, 11598
- [30] Bai, R., Pettit, G. R., Getanunt, Z., *et al.*; *J. Biol. Chem.* (1996) **271** 12639
- [31] Downing, K. H.; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2000) **16**, 89
- [32] Shearwin, K., Timasheff, S.; *Biochemistry* (1994) **33** 894
- [33] Hamel, E.; *Pharmac. Ther.* (1992) **55**, 31

- [34] Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1971) **93**, 2325
- [35] Cortes, J. E., Pazdur, R.; *J. Clin. Oncol.* (1995) **13**, 2643
- [36] Höfle, G., Bedorf, N., Gerth, K., *et al.*; *Chem. Abstr.* (1993) **120**, 52841
- [37] Grever, M. R., Schepartz, S. A., Chabner, B. A.; *Semin. Oncol.* (1992) **19**, 622
- [38] Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., *et al.*; *Cancer Res.* (1995) **55**, 2325
- [39] Kowalski, R. J., Giannakakou, P., Hamel, E.; *J. Biol. Chem.* (1997) **272**, 2534
- [40] Beckwith, M., Urba, W., Longo, D.; *J. Natl. Cancer Inst.* (1993) **85**, 483
- [41] Steube, K., Grunicke, D., Pietsch, T., *et al.*; *Leukemia* (1992) **6**, 1048
- [42] Verdier-Pinard, P., Kepler, J., Pettit, G., *et al.*; *Mol. Pharmac.* (2000) **57**, 180
- [43] Kobayashi, M., Natsume, T., Tamaoki, S., *et al.*; *Jpn. J. Cancer Res.* (1997) **88**, 316
- [44] Jordan, M., Walker, D., Arruda, M., *et al.*; *Biochemistry* (1998) **37**, 17571
- [45] Quant, J., Dissertation, Universität Frankfurt a.M., 1997
- [46] Alattia, T., Roux, F., Cave, A., *et al.*; *Tetrahedron* (1995) **51**, 2593
- [47] Boretzki, M., Dissertation, Universität Frankfurt a.M., 1996
- [48] Belik, D., Dissertation, Universität Frankfurt a.M., 1996
- [49] Tomioka, K., Kanai, M., Koga, K.; *Tetrahedron Letters* (1991) **32**, 2395
- [50] Coste, J., Frerot, E., Jouin, P.; *Tetrahedron Letters* (1991) **32**, 1967

- [51] Coste, J., Frerot, E., Jouin, P.; *J. Org. Chem.* (1994) **59**, 2437
- [52] Wissmann, H., Kleiner, H.; *Angew. Chem.* (1980) **92**, 129
- [53] King, D., Fields, C., Fields, G.; *Int. J. Peptide Protein Res.* (1990) **35**, 255
- [54] Hoechst AG, Frankfurt a.M., Deutschland, EP 0 717 048 A1, 19.06.1996
- [55] Drakenberg, T., Dahlqvist, K., Forsen, S.; *J. Phys. Chem.* (1972) **76**, 2178
- [56] Brünger, A., X-PLOR: A System for X-ray Crystallographie and NMR, (1992), Yale University Press, New Haven, CT
- [57] Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, **15/1**, S.314 ff.
- [58] Wu, C. H., Chung, W. S., *J. Org. Chem.* (1999) **64**, 2673
- [59] Hu, T. Q., Weiler, L., *Can. J. Chem.* (1994) **72**, 1500
- [60] Corey, E. J., Székely, I., Shiner, C. S., *Tetrahedron Letters* (1977) **40**, 3529
- [61] Mancuso, A., Swern, D., *Synthesis* (1981), 165
- [62] Dutta, K., Coffey, L., Reith, M.; *J. Med. Chem.* (1998) **41**, 699
- [63] Inanaga, J., Hirata, K., Saeki, H., *et al.*; *Bull. Chem. Soc. Japan* (1979) **52**, 1989
- [64] Horowitz, R., Ullyot, G.; *J. Am. Chem. Soc.* (1952) **74**, 587
- [65] Dumont, R., Brossi, A.; *J. Org. Chem.* (1986) **51**, 2515
- [66] Ducray, P., Lebeau, L., Mioskowski, C.; *Helv. Chim. Acta* (1996) **79**, 2346
- [67] Williams, R., Lee, J.; *Methods in Enzymology* (1982) **85**, 376

- [68] Bradford, M.; *Analytical Biochemistry* (1976) **72**, 248
- [69] Gaskin, F., Cantor, C.; *J. Mol. Biol.* (1974) **89**, 737
- [70] Vallee, R.; *Methods in Enzymology* (1986) **134**, 89
- [71] Harris, E., Angal, S.; Protein purification methods, 1. Auflage, IRL Press, S.126 ff.
- [72] Grover, S., Boye, O., Getahun, Z., *et al.*; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1992) **187**, 1350
- [73] Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., *et al.*; *J. Mol. Biol.* (1998) **279**, 449
- [74] Grathwohl, C., Wüthrich, K.; *Biopolymers* (1981) **20**, 2623
- [75] Abragam, A.; Principles of Nuclear Magnetism, 1. Auflage, Oxford University Press, (1961)
- [76] Ernst, R. R., Bodenhausen, G., Wokaun, A.; Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions, 1. Auflage, Oxford University Press, (1987)
- [77] Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G., *et al.*; Protein NMR Spectroscopy, 1. Auflage, Academic Press, (1996)
- [78] Lipari, G., Szabo, A.; *J. Am. Chem. Soc.* (1982) **104**, 4546
- [79] Lipari, G., Szabo, A.; *J. Am. Chem. Soc.* (1982) **104**, 4559
- [80] Marshall, A. G., Schmidt, P. G., Sykes, *Biochemistry* (1972) **11**, 3875

- [81] Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) **94**, 12366
- [82] Goldman, M.; *J. Magn. Res.* (1984) **60**, 437
- [83] Schulte-Herbrüggen, T., Sörensen, O. W.; *J. Magn. Res.*, (2000) **144**, 123
- [84] Farrar, T. C., Stringfellow, T. C.; *Encyclopedia of NMR*, (1996) **6**, 4101
- [85] Uhlenbeck, O.; *Nature* (1987) **328**, 596
- [86] Symons, R.; *TIBS* (1989) **14**, 445
- [87] Pley, H., Flaherty, K., McKay, D.; *Nature* (1994) **372**, 68
- [88] Scott, W., Finch, J., Klug, A.; *Cell* (1995) **81**, 991
- [89] Scott, W., Murray, J., Arnold, J., *et al.*; *Science* (1996) **274**, 2065
- [90] Koizumi, M., Ohtsuka, E.; *Biochemistry* (1991) **30**, 5145
- [91] Murray, J., Terwey, D., Maloney, L.; *Cell* (1998) **92**, 665
- [92] Hollemann, A., Wiberg, E.; *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 91.-100. Auflage, Berlin, de Gruyter, (1985)
- [93] Ray, W., Burgner, J., Deng, H., *et al.*; *Biochemistry* (1993) **32**, 12977
- [94] Stankiewicz, P., Tracey, A., Crans, D.; *metal ions in biological systems* (1995) **31**, 287
- [95] Gresser, M., Tracey, A.; *J. Am. Chem. Soc.* (1986) **108**, 1935
- [96] Tracey, A., Jaswal, J., Gresser, M., *et al.*; *Inorg. Chem.* (1990) **29**, 4283

- [97] Wlodawer, A., Miller, M., Sjölin, L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) **80**, 3628
- [98] Howarth, O.; *Prog. NMR Spect.* (1990) **22**, 453
- [99] Rehder, D., Weidemann, C., Duch, A., *et al.*; *Inorg. Chem.* (1988) **27**, 584
- [100] Howarth, O., Jarrold, M.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1978), 503
- [101] Heath, E., Howarth, O.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1981), 1105
- [102] Tracey, A., Leon-Lai, C.; *Inorg. Chem.* (1991) **30**, 3200
- [103] Geraldès, C., Castro, M.; *J. Inorg. Biochem.* (1989) **37**, 213
- [104] Angus-Dunne, S., Batchelor, R., Tracey, A., *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* (1995) **117**, 5292
- [105] Simorre, J., Legault, P., Hangar, A., *et al.*; *Biochemistry* (1997) **36**, 518
- [106] Sklenár, V., Bax, A., *J. Magn. Res.* (1987) **74**, 469
- [107] Tuschl, T., Gohlke, C., Jovin, T., *et al.*; *Science* (1994) **266**, 785
- [108] Darnell, J.; *Molecular Cell Biology*, New York, Scientific American Books, (1990)
- [109] James, P., Inui, M., Tada, M., *et al.*; *Nature* (1989) **342**, 90
- [110] Jackson, W., Colyer, J.; *Biochem. J.* (1996) **316**, 201
- [111] Toyofuku, T., Kurzydowski, K., Tada, M., *et al.*; *J. Biol. Chem.* (1994) **269**, 22929

- [112] Vorherr, T., Wrzosek, A., Chiesi, M., *et al.*; *Protein Science* (1993) **2**, 399
- [113] Fujii, J., Maruyama, K., Tada, M.; *J. Biol. Chem.* (1989) **264**, 12950
- [114] Reddy, L., Jones, L., Thomas, D.; *Biochemistry* (1999) **38**, 3954
- [115] Tatulian, S., Jones, L., Reddy, L., *et al.*; *Biochemistry* (1995) **34**, 4448
- [116] Pollesello, P., Annala, A., Ovaska, M.; *Biophys. J.* (1999) **76**, 1784
- [117] Mortishire-Smith, R., Pitzenberger, S., Burke, C., *et al.*; *Biochemistry* (1995) **34**, 7603
- [118] Simmerman, H., Kobayashi, Y., Autry, J., *et al.*; *J. Biol. Chem.* (1996) **271**, 5941
- [119] Gratias, R., Kessler, H.; *J. Phys. Chem. B* (1998) **102**, 2027
- [120] Aue, W., Bartholdi, E., Ernst, R.; *J. Chem. Phys.* (1976) **64** 2229
- [121] Braunschweiler, L., Ernst, R.; *J. Magn. Res.* (1983) **53** 521
- [122] Kumar, A., Ernst, R., Wüthrich, K.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1980) **95**, 1
- [123] Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R.; *J. Magn. Res.* (1989) **85**, 393
- [124] Piotto, M., Saudek, V., Sklenar, V.; *J. Biomol. NMR* (1992) **2**, 661
- [125] Wüthrich, K.; *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, New York, John Wiley & Sons Inc., (1986)
- [126] Titman, J., Keeler, J.; *J. Magn. Res.*, (1990) **89**, 640
- [127] Pardi, A., Billeter, M., Wüthrich, K.; *J. Mol. Biol.*, (1984) **180**, 741
- [128] Wishart, D., Sykes, B., Richards, F.; *J. Mol. Biol.* (1991) **222**, 311

-
- [129] Fletcher, C., Jones, D., Diamond, D., *et al.*; *J. Biomol. NMR* (1996) **8**, 292
- [130] Konradi, R., Billeter, M., Wüthrich, K., *J. Mol. Graphics* (1996) **14**, 51
- [131] Laskowski, R., Rullmann, J., MacArthur, M., *et al.*, *J. Biomol. NMR* (1996) **8**, 477
- [132] Rose, G., Gierasch, L., Smith, J., *Adv. Protein Chem.* (1985) **37**, 1
- [133] Hughes, G. East, J., Lee, A., *Biochem. J.* (1994) **303**, 511
- [134] Smorada, R., Truce, W.; *J. Org. Chem.* (1979) **44**, 3442
- [135] Laemmli, U.; *Nature* (1970) **227**, 681

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. H. Bock, Prof. Dr. B. Brutschy, Prof. Dr. F. J. Comes, Prof. Dr. E. Egert, Prof. Dr. J. W. Engels, Prof. Dr. H. Fasold, Prof. Dr. M. Göbel, Prof. Dr. S. Glaser, Prof. Dr. C. Griesinger, Prof. Dr. K. Hensen, Prof. Dr. G. Kohlmaier, Prof. Dr. Kolbesen, Prof. Dr. W. Martiensen, Prof. Dr. J. Mulzer, Prof. Dr. Nultsch, Prof. Dr. G. Quinkert, Prof. Dr. E. A. Reinsch, Prof. Dr. Rüterjans, Prof. Dr. R. Schlögel, Prof. Dr. H. Schwalbe, Prof. Dr. Trömel

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Stefanie Lamberth

geb. 21.06.1968, Viernheim

ledig

Vater: Karl Lamberth, Rentner

Mutter: Agnes Lamberth, geb. Maier, Hausfrau

Schulbildung:

1975-1979

Grundschule, Friedrich-Fröbel-Schule in Viernheim

1979-1988

Gymnasium, Albertus-Magnus-Schule in Viernheim

Berufsausbildung:

1988-1991

Chemielaborant bei der BASF AG in Ludwigshafen

Studium:

10/1991-05/1996

Chemiestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt

Abschluß des Studiums mit Diplom, Note „sehr gut“

Thema der Diplomarbeit: „Beiträge zur Synthese von Dolastatin 10-Derivaten“

08/1996-09/2000

Anfertigen der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Griesinger, Assistententätigkeit am Institut für Organische Chemie

08/1996

Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Chemische und Biologische Synthese von Wirkstoffen“ des Instituts für Organische Chemie

08/1996

Stipendium des Graduiertenkollegs „Chemische und Biologische Synthese von Wirkstoffen“

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt, den

(Stefanie Lamberth)

NMR Solution Structure of Phospholamban

by **Stefanie Lamberth**^{a)}, **Holger Schmid**^{b)}, **Martin Muenchbach**^{b)}, **Thomas Vorherr**^{b)}, **Joachim Krebs**^{b)},
Ernesto Carafoli^{b)c)}, and **Christian Griesinger**^{*a)1)}

^{a)} Institute of Organic Chemistry, University of Frankfurt, Marie-Curie-Str. 11, D-60439 Frankfurt
(Phone: +49 69 79829130; fax: +49 69 79829128; e-mail: cigr@org.chemie.uni-frankfurt.de)

^{b)} Institute of Biochemistry, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Universitätstrasse 16,
CH-8092 Zürich

^{c)} Department of Biological Chemistry, University of Padova, Via Colombo, I-35121 Padova

Dedicated to Professor *Albert Eschenmoser* on the occasion of his 75th birthday

Phospholamban (PLN), an amphipathic intrinsic membrane protein of 52 amino acids, is the modulator of the Ca^{2+} pump of cardiac, slow-twitch, and smooth-muscle sarcoplasmic reticulum. In response to β -adrenergic stimulation, it becomes phosphorylated at Ser¹⁶ and/or Thr¹⁷, and dissociates from the pump, which, in turn, achieves its full activity. Here we present the three-dimensional structure of chemically synthesized, monomeric PLN in an organic solvent. Monomerization (PLN normally forms homopentamers) was obtained by replacing Cys⁴¹ with phenylalanine (Phe = F), a modification that did not affect biological activity. The structure was determined by high-resolution NMR in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ of the unphosphorylated state of $[\text{F}^{41}]$ PLN (C41F). Of the hydrophilic cytoplasmic parts IA (Met¹ to Pro²¹) and IB (Gln²² to Asn³⁰) and the membrane-spanning hydrophobic domain II (Leu³¹ to Leu⁵²) of PLN, domain IA, which contains the two phosphorylation sites Ser¹⁶ and Thr¹⁷, and domain II have been suggested to be helical and connected through the less-structured hinge-region IB. In the structural study presented here, $[\text{F}^{41}]$ PLN is composed of two α -helical regions connected by a β -turn (type III). The residues of the β -turn (type III) are Thr¹⁷, Ile¹⁸, Glu¹⁹, and Met²⁰, the first being one of the two phosphorylation sites (Ser¹⁶ and Thr¹⁷). The hinge region is located at the C-terminal end of domain IA, and domain IB is part of a second helix. The two α -helices comprising amino acids 4–16 and 21–49 are well-defined (the root-mean-square deviations for the backbone atoms, calculated for a family of the structures, are 0.58 and 0.92 Å, resp.). Pro²¹ is at the beginning of the C-terminal helix and in the *trans* conformation.

Introduction. – Free Ca^{2+} in the myoplasm controls the contraction and relaxation of muscles. The sarcoplasmic reticulum (SR) calcium pump (SERCA), a 110 kDa protein belonging to the family of P-type ATPases [1] removes Ca^{2+} from the myoplasm and works in association with Ca^{2+} -releasing channels in the SR membrane to maintain the appropriate calcium level in the cell. In cardiac muscles, the activity of the Ca^{2+} pump is modulated by β -adrenergic agonists, which regulate contractile force and muscle relaxation [2]. These effects are mediated by the phosphorylation of a small amphipathic SR protein, phospholamban (PLN), by two kinases [3][4]. PLN is a membrane-intrinsic protein of 52 amino acids (see *Fig. 1*) that interacts with the cardiac, slow-twitch, and smooth-muscle isoforms of the SERCA pump, keeping it in an inhibited state. Phosphorylation of PLN Ser¹⁶ by the cAMP-dependent protein kinase (PKA) [4] or of Thr¹⁷ by a calmodulin-dependent kinase [5], or of both, causes PLN dissociation from the ATPase, relieving its inhibition.

¹⁾ Also: Max Planck Institut für biophysikalische Chemie, Am Faßberg, D-37077 Göttingen, Germany.

10 20 30 40 50

MDKVQYLTRSAITTTASTIEMPQQARQNLQNLFINFCLILICLLLICIIIVMLL

Fig. 1. *Amino acid sequence of PLN.* The two phosphorylation sites Ser¹⁶ and Thr¹⁷ are underlined, and the position of the mutation (replacement of Cys⁴¹ by Phe⁴¹ yielding [F⁴¹]PLN) is doubly underlined.

Cross-linking experiments by *James et al.* [6] using a photoaffinity labeling probe showed that Lys³ of PLN in the cytoplasmic domain bound to a region of the Ca²⁺ pump just downstream of its phosphorylation site (Asp³⁵¹). The efficiency of cross-linking was significantly reduced by calcium or when PLN was phosphorylated. These results indicated that PLN inhibits the pump through electrostatic interactions involving basic residues in the N-terminal, cytosolic domain of PLN and acidic residues near the active site of the pump, *i.e.*, the ATP-binding site and the phosphorylated aspartate. This view was corroborated by mutagenesis experiments [7], which confirmed that residues 397–402 (³⁹⁷DDKPV⁴⁰²), in the acylphosphorylation domain of the pump were critical for the interaction, stressing the importance of charged side chains in the interaction of the two proteins. On the other hand, recent mutational screening experiments [8] [9] have provided evidence for hydrophobic interactions between the transmembrane domains of PLN (domain II) and of the Ca²⁺ pump, especially transmembrane helix 6 of the latter.

PLN has a strong tendency to form homopentamers. However, according to recent evidence (see below), the form that regulates the SERCA pump *in vivo* is the monomer [10]. It was thus decided to determine the structure of monomeric PLN, specifically, that of the [F⁴¹]PLN monomer (replacement of Cys⁴¹ by Phe⁴¹), which has no propensity to form pentamers and the biological activity of which is similar to that of wild-type PLN [11]. Structural studies on portions of PLN have provided evidence for a high helical content of the protein [12] [13], in agreement with preliminary NMR experiments on the PLN mutant [F⁴¹]PLN (also called C41F) [14]. The work presented here describes the first determination of the three-dimensional structure of [F⁴¹]PLN, obtained by two-dimensional homonuclear NMR spectroscopy. It shows that [F⁴¹]PLN is composed of two helical portions spanning residues 4–16 (adjacent to the kinase substrates Ser¹⁶ and Thr¹⁷) and 21–49. The two helices are connected by a β -turn (type III) that includes one of the phosphorylation sites, Thr¹⁷.

Results and Discussion. – *NMR-Spectroscopy and Assignment of [41-Phenyl-alanine]phospholamban ([F⁴¹]PLN).* The structure of [F⁴¹]PLN was determined by two-dimensional homonuclear NMR spectroscopy in CHCl₃/MeOH 1:1 (v/v), a solvent mixture mimicking the environment of biological membranes [15]. The ¹H-NMR assignments of the majority of amino-acid spin systems were obtained by a combination of DQF-COSY and TOCSY experiments conducted according to standard procedures [16]. Because of missing cross-peaks in the H^N,H ^{α} region of the DQF-COSY due to small ³J_{H^NH ^{α}} coupling constants or overlap of the cross-peaks, a TOCSY with a mixing time of 30 ms was used to identify those cross-peaks. At an early stage of the assignment, the unique amino acids Asp², Lys³, Tyr⁶, and Pro²¹ were assigned unambiguously. In the case of Asp², Lys³, and Pro²¹, the typical spin systems of the amino acids were detected in the DQF-COSY, and in the case of Tyr⁶ the resonances of the aromatic side chain could be easily recognized in the 800-MHz NOESY. Most of the other spin systems could be identified, but for the sequential assignment, the 800-MHz

NOESY proved indispensable (Fig. 2). Except for Ser¹⁰, Arg¹⁴, Met²⁰, Cys³⁶, and Ile⁴⁷, all spin systems could be determined by analyzing the sequential $H^\alpha, H^N(i, i+1)$ and $H^N, H^N(i, i+1)$ cross-peaks. For the above-mentioned five amino acids, the assignment was accomplished by means of the medium-range $H^\alpha, H^N(i, i+3)$ and $H^\alpha, H^N(i, i+4)$ cross-peaks in the 800-MHz NOESY (Fig. 3). The assignments are listed in Table 1.

Only five $^3J_{HNH^\alpha}$ coupling constants could be measured from the fine structure of COSY cross-peaks by comparison with the in-phase *ms* of cross-peaks in the NOESY [17]. In this region of the spectra, several cross-peaks were missing due to small coupling constants (< 4 Hz) or overlap of the cross-peaks.

The H^α chemical shifts of the residues Val⁴ to Thr¹⁷ and Gln²³ to Val⁴⁹ are shifted to higher field compared to their random-coil values, implying an α -helical structure

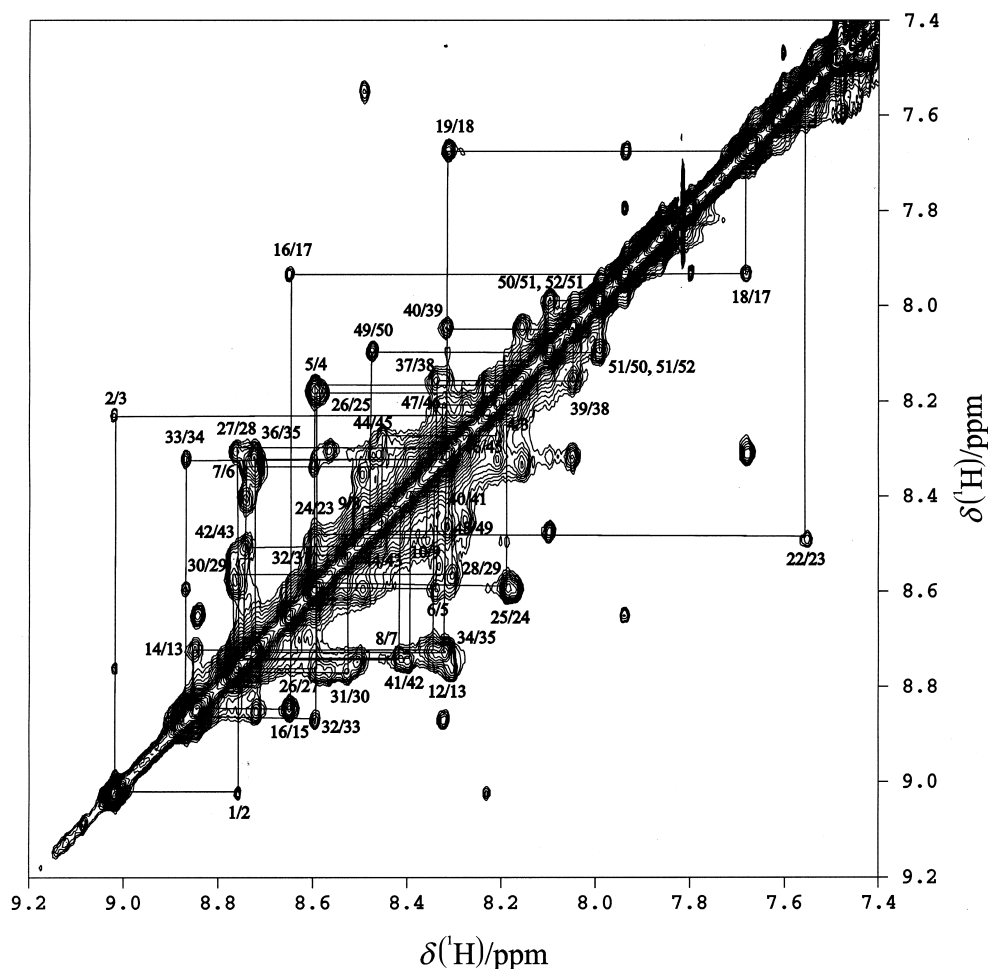


Fig. 2. H^N, H^N Region of the 800-MHz NOESY, acquired at 300 K with a mixing time of 150 ms, of 1 mM $[F^{41}]PLN$ in $CHCl_3/MeOH$ 1:1 (v/v). Sequential NOEs are indicated in the spectrum, the first number refers to the H^N resonance in ω_1 , the second to that in ω_2 .

Table 1. *[41-Phenylalanine]phospholamban* [*F*⁴¹]*PLN* ¹H-NMR Assignment (CDCl₃/CD₃OH (1 : 1 (v/v)))

Residue	H ^N	H ^α	H ^β	Others
Met 1	8.76	4.45	2.22 (<i>pro-S</i>), 2.28 (<i>pro-R</i>)	H ^γ 2.83 (<i>pro-S</i>), 2.77 (<i>pro-R</i>)
Asp 2	9.02	4.68	3.16 (<i>pro-R</i>), 3.03 (<i>pro-S</i>)	
Lys 3	8.10	4.24	2.08 (<i>pro-R</i>), 2.21 (<i>pro-S</i>)	H ^γ 1.82 (<i>pro-R</i>), 1.68 (<i>pro-S</i>), H ^δ 1.89, H ^ε 3.12
Val 4	8.08	3.82	2.42	H ^γ 1.28 (<i>pro-R</i>), 1.16 (<i>pro-S</i>)
Gln 5	8.53	4.20	2.43	H ^γ 2.67 (<i>pro-R</i>), 2.54 (<i>pro-S</i>), H ^ε 7.55, 6.75
Tyr 6	8.28	4.27	3.31	H ^δ 7.17, H ^ε 6.89
Leu 7	8.66	4.10	2.12 (<i>pro-S</i>), 1.79 (<i>pro-R</i>)	H ^δ 1.15
Thr 8	8.36	4.02	4.39	H ^γ 1.41
Arg 9	8.44	4.15	1.99 (<i>pro-S</i>), 2.15 (<i>pro-R</i>)	H ^γ 1.80, H ^δ 3.36, H ^ε 7.78
Ser 10	8.30	4.20	4.05 (<i>pro-S</i>), 3.96 (<i>pro-R</i>)	
Ala 11	8.31	4.21	1.76	
Ile 12	8.28	3.85	2.12	H ^γ 1.74, H ^δ 1.03
Arg 13	8.66	4.10	2.13	H ^γ 2.08 (<i>pro-R</i>), 1.78 (<i>pro-S</i>), H ^δ 3.37 (<i>pro-S</i>), 3.29 (<i>pro-R</i>), H ^ε 7.81
Arg 14	8.79	4.16	2.14	H ^γ 2.05 (<i>pro-S</i>), 1.85 (<i>pro-R</i>), H ^δ 3.34, H ^ε 7.52
Ala 15	8.78	4.23	1.74	
Ser 16	8.59	4.36	4.26 (<i>pro-S</i>), 4.16 (<i>pro-R</i>)	
Thr 17	7.88	4.22	4.53	H ^γ 1.52
Ile 18	7.62	4.24	2.18	H ^{γ1} 1.88, H ^{γ2} 1.15, H ^δ 1.46
Glu 19	8.24	4.44	2.38 (<i>pro-S</i>), 2.31 (<i>pro-R</i>)	H ^γ 2.73, 2.64
Met 20	8.40	4.58	2.56 (<i>pro-R</i>), 2.34 (<i>pro-S</i>)	H ^γ 2.97 (<i>pro-S</i>), 2.79 (<i>pro-R</i>)
Pro 21		4.47	2.49 (<i>pro-S</i>), 2.04 (<i>pro-R</i>)	H ^γ 2.45 (<i>pro-R</i>), 2.15 (<i>pro-S</i>), H ^δ 3.91
Gln 22	7.51	4.34	2.41 (<i>pro-R</i>), 2.35 (<i>pro-S</i>)	H ^γ 2.66 (<i>pro-R</i>), 2.61 (<i>pro-S</i>), H ^ε 7.75, 6.86
Gln 23	8.43	4.16	2.43 (<i>pro-R</i>), 2.34 (<i>pro-S</i>)	H ^γ 2.55, H ^ε 7.46, 6.66
Ala 24	8.53	4.30	1.70	
Arg 25	8.12	4.07	2.21 (<i>pro-S</i>), 2.14 (<i>pro-R</i>)	H ^γ 1.93 (<i>pro-S</i>), 1.83 (<i>pro-R</i>), H ^δ 3.44
Gln 26	8.53	4.10	2.35 (<i>pro-S</i>), 2.29 (<i>pro-R</i>)	H ^γ 2.54 (<i>pro-S</i>), 2.42 (<i>pro-R</i>), H ^ε 7.26, 6.83
Asn 27	8.70	4.64	3.22 (<i>pro-R</i>), 2.88 (<i>pro-S</i>)	H ^δ 7.61, 6.95
Leu 28	8.25	4.25	2.04 (<i>pro-R</i>), 1.88 (<i>pro-S</i>)	H ^δ 1.09
Gln 29	8.51	4.21	2.45 (<i>pro-R</i>), 2.35 (<i>pro-S</i>)	H ^γ 2.64 (<i>pro-R</i>), 2.53 (<i>pro-S</i>), H ^ε 7.49, 6.76
Asn 30	8.71	4.65	3.25 (<i>pro-R</i>), 2.95 (<i>pro-S</i>)	H ^δ 7.79, 6.84
Leu 31	8.48	4.70	2.20 (<i>pro-S</i>), 2.11 (<i>pro-R</i>)	H ^γ 1.93, H ^δ 1.09
Phe 32	8.37	4.50	3.49	H ^δ 7.40
Ile 33	8.81	3.78	2.26	H ^γ 2.14, 1.54, H ^δ 1.15
Asn 34	8.27	4.54	3.11 (<i>pro-R</i>), 2.84 (<i>pro-S</i>)	H ^δ 7.41, 6.66
Phe 35	8.67	4.43	3.45	H ^δ 7.36
Cys 36	8.26	4.00	3.31 (<i>pro-R</i>), 2.76 (<i>pro-S</i>)	
Leu 37	8.20	4.14	2.16	H ^γ 1.85, H ^δ 1.08 (<i>pro-S</i>), 1.00 (<i>pro-R</i>)
Ile 38	8.11	3.86	2.17	H ^γ 1.29, H ^δ 1.03
Leu 39	7.91	4.11	1.87	H ^γ 1.72, H ^δ 0.95
Ile 40	8.26	3.79	2.20	H ^{γ1} 1.97, H ^{γ2} 1.32, H ^δ 1.00
Phe 41	8.34	4.40	3.25	H ^δ 7.39
Leu 42	8.60	4.12	2.15	H ^γ 1.73, H ^δ 1.07
Leu 43	8.44	4.05	2.07, 1.61	H ^δ 1.11
Leu 44	8.36	4.15	2.05	H ^γ 1.86, H ^δ 1.04
Ile 45	8.23	3.78	2.21	H ^{γ1} 1.57 (<i>pro-R</i>), 1.23 (<i>pro-S</i>), H ^{γ2} 1.07, H ^δ 0.79
Cys 46	8.15	4.14	3.46 (<i>pro-R</i>), 2.94 (<i>pro-S</i>)	
Ile 47	8.25	3.78	2.16	H ^{γ1} 2.33, 2.20, H ^{γ2} 1.30, H ^δ 1.24
Ile 48	8.47	3.84	2.08	H ^{γ1} 2.01, H ^{γ2} 1.30, H ^δ 1.02
Val 49	8.32	3.85	2.38	H ^γ 1.24 (<i>pro-R</i>), 1.14 (<i>pro-S</i>)
Met 50	8.02	4.44	2.57 (<i>pro-S</i>), 2.32 (<i>pro-R</i>)	H ^γ 2.96 (<i>pro-S</i>), 2.77 (<i>pro-R</i>)
Leu 51	7.84	4.59	2.06, 1.77	H ^δ 1.06
Leu 52	8.02	4.53	2.08	H ^γ 1.76, H ^δ 1.04

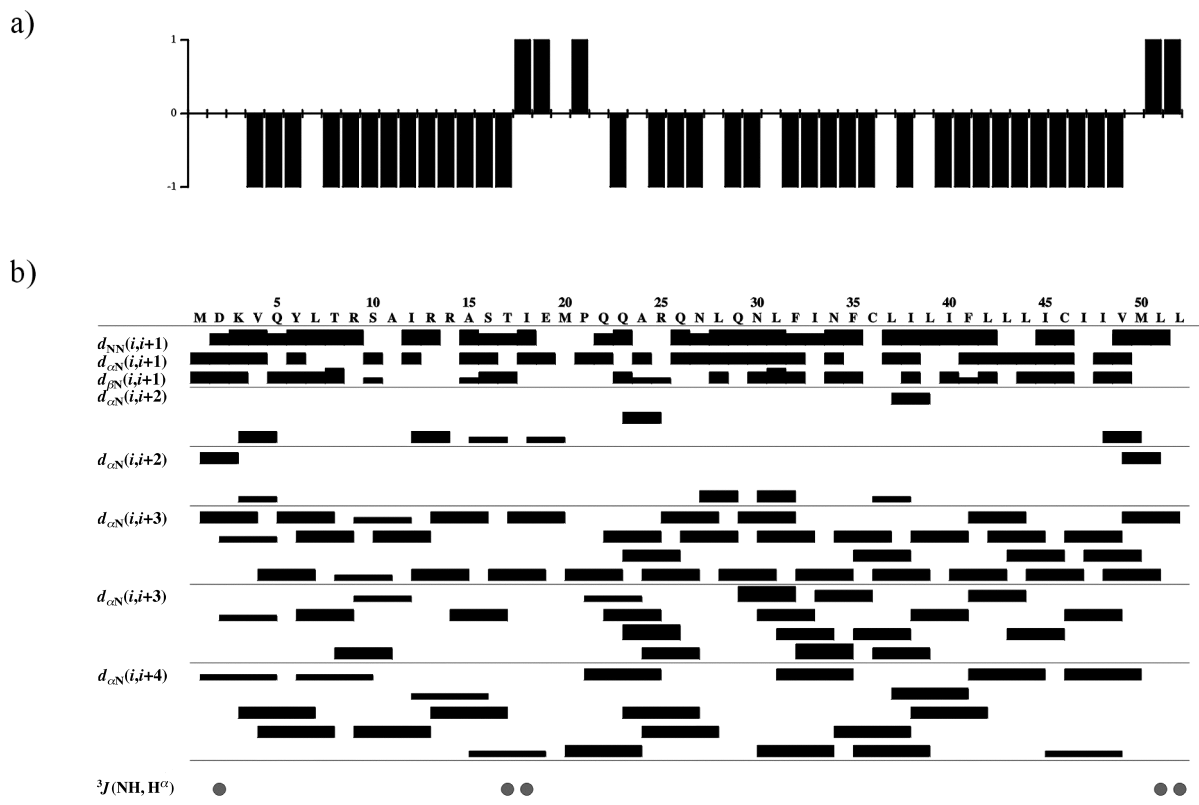


Fig. 4. a) CSI Plot of the protons H^a according to [17]. b) Summary of sequential and medium-range NOEs involving the protons H^N , H^a , and H^b of modified phospholamban $[F^{41}]PLN$. Sequential and medium-range NOEs classified as strong, medium, and weak according to the intensity of the cross-peaks are indicated by different heights of the connecting box, $^3J(NH, H^a)$ are represented by full circles.

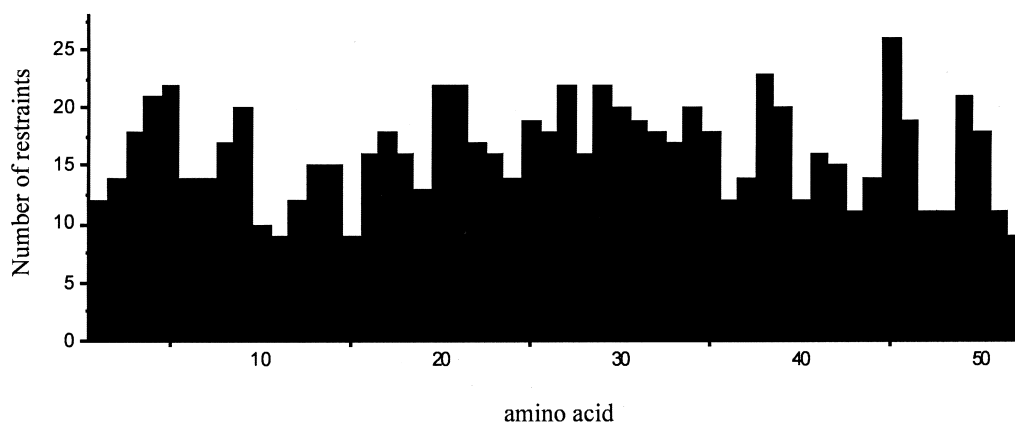


Fig. 5. Number of NOE restraints per residue

Structure of [41-Phenylalanine]phospholamban ([F⁴¹]PLN). The structural restraints listed were used in a simulated annealing protocol [19] in the program X-PLOR [20] (for details, see *Exper. Part*) to calculate a final set of ten structures. Due to the flexibility of the region between the N- and C-terminal α -helices, it is impossible to superimpose the whole molecule. Fig. 6 illustrates a best-fit superposition of the backbone atoms of the N-terminal α -helix and of the C-terminal α -helix. The residues at the beginning and at the end of the helical parts are ill-defined by the NMR data and appear disordered. The final ten structures are converged with an r.m.s.d. from the

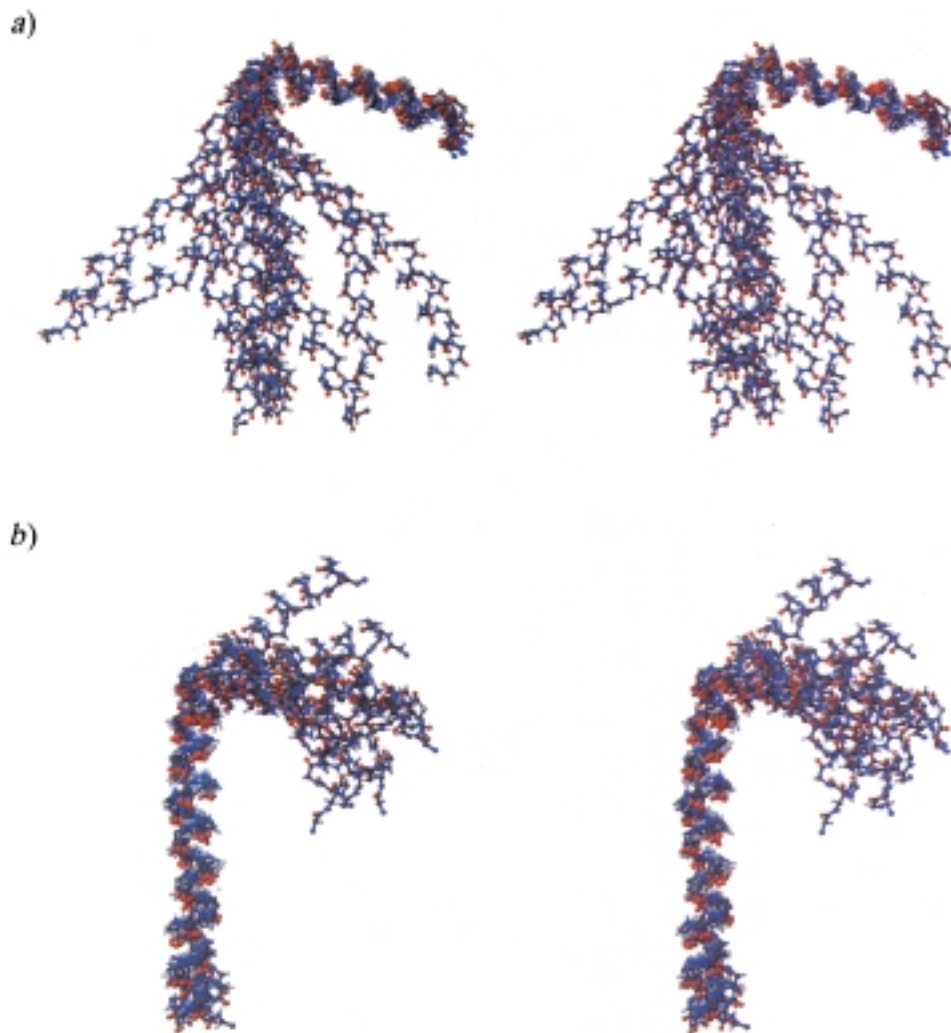


Fig. 6. Best-fit superpositions of the backbone atoms of a) N-terminal helix (residues Val⁴ to Ser¹⁶). b) C-terminal helix (residues Pro²¹ to Val⁴⁹) of the final ten NMR-derived structures of [F⁴¹]PLN. For the N-terminal helix (Val⁴ to Ser¹⁶), superposition yields an r.m.s.d. value of 0.58 Å and for the C-terminal helix (Pro²¹ to Val⁴⁹) an r.m.s.d. value of 0.92 Å for all backbone atoms referring to a mean structure.

mean structure of 0.58 Å for all backbone atoms in the N-terminal helix of [F⁴¹]PLN (residues 4–16) and 0.92 Å for all backbone atoms in the C-terminal helix of [F⁴¹]PLN (residues 21–49). The ten structures exhibited no distance violations exceeding 0.30 Å or dihedral-angle violations exceeding 5° and have an average 89.6% of all residues in the most favorable region of the *Ramachandran* plot according to the PROCHECK-NMR [21] procedure. None of the residues were found in disallowed regions of the *Ramachandran* plot (Fig. 7). The structural statistics are summarized in Table 2.

The structure of [F⁴¹]PLN contains two α -helical regions connected by a β -turn (type III) comprising the four residues N-terminal to Pro²¹ (Fig. 8). These four residues (Thr¹⁷, Ile¹⁸, Glu¹⁹, and Met²⁰) have about as many restraints per residue as there were for the residues in the α -helical regions. The mutual orientation of the helices was only weakly restrained by medium-range distance NOEs in the turn. The δ -protons of Pro²¹ show only weak NOEs to the H $^{\alpha}$ of Thr¹⁷ and Ile¹⁸ and to the H^N of Glu¹⁹. Therefore, the relative orientation between the two α -helical parts of the molecule is not well-defined.

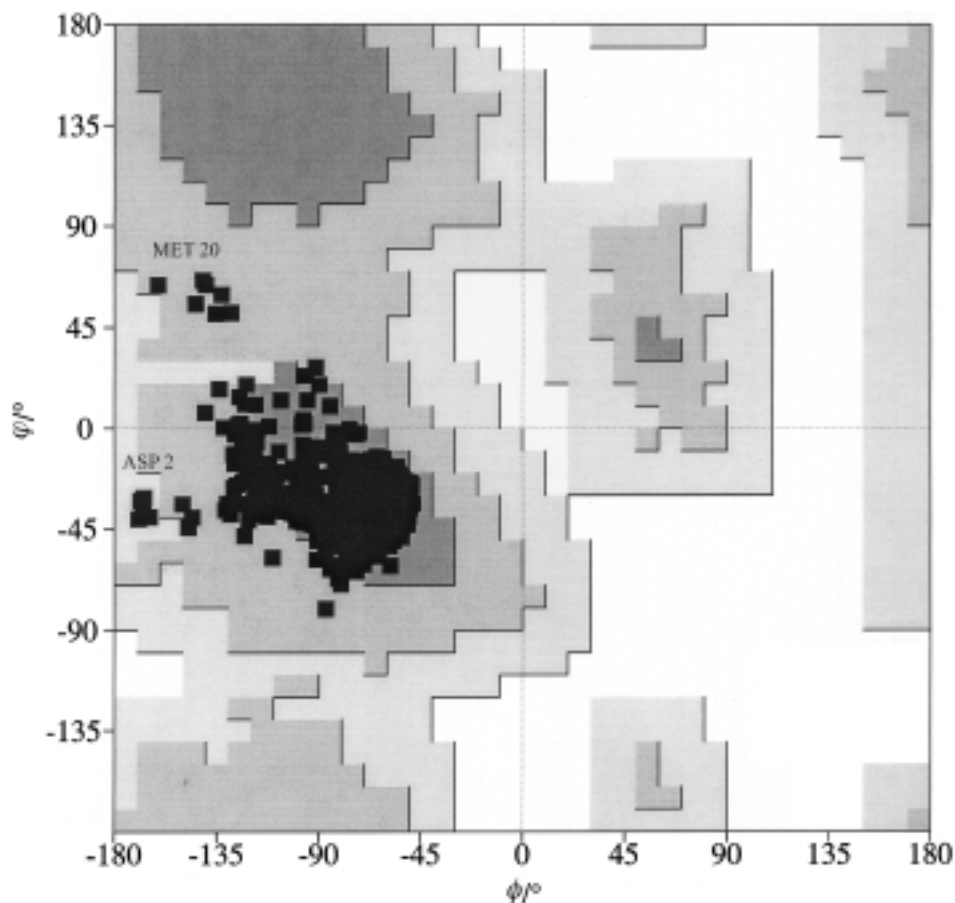


Fig. 7. *Ramachandran plot of the ten final NMR-derived structures of [F⁴¹]PLN: 90% in the allowed region, 10% in the favored region, and 0% in the disallowed region*

Table 2. *Characteristics of the Structure of $[F^{41}]PLN$ in $CDCl_3/CD_3OD$ 1:1 (v/v)*

Parameter	Value
Distance restraints: total	644
intraresidual	398
sequential	142
medium-range	104
Dihedral restraints	5
R.m.s.d. [\AA] for region 4–16: backbone atoms	0.58 ± 0.22
heavy atoms	1.51 ± 0.41
R.m.s.d. [\AA] for region 21–49: backbone atoms	0.92 ± 0.31
heavy atoms	1.42 ± 0.56
ϕ and ψ in core or allowed	99%

Owing to the structural imprecision in the turn, the family of structures displays a dispersion in the relative position of the amino- and carboxy-terminal helices. But this dispersion is limited, and the interhelical angle is *ca.* $68 \pm 23^\circ$ for ten structures, in agreement with the observation by *Pollesello et al.* [12].

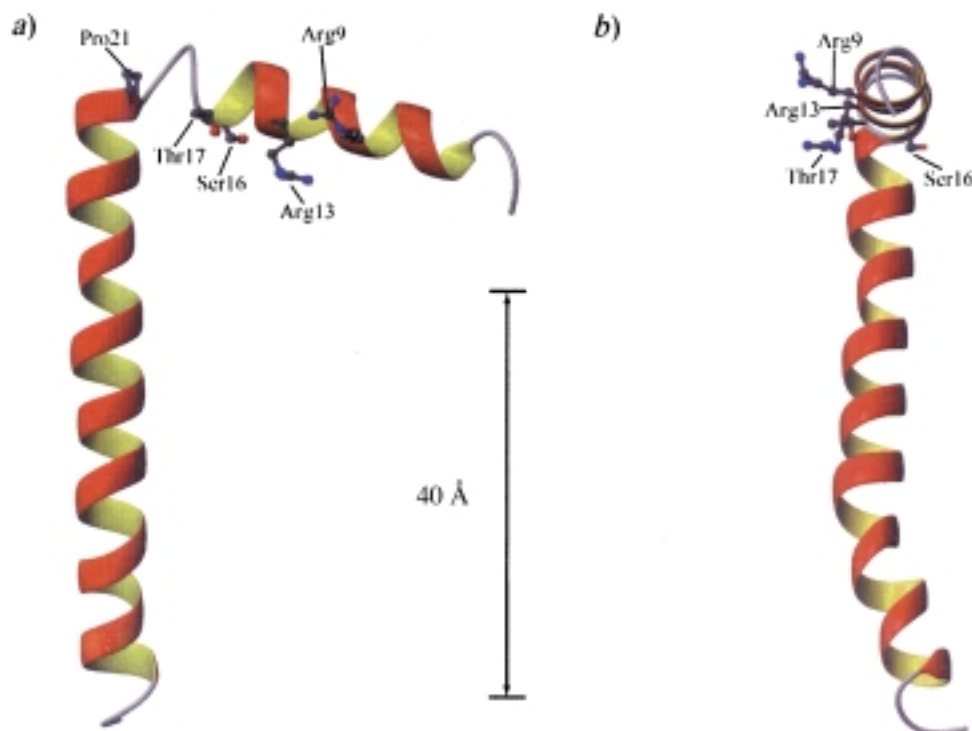


Fig. 8. *Ribbon representation of lowest-energy structure of $[F^{41}]PLN$. Arg⁹, Arg¹³, Ser¹⁶, Thr¹⁷, and Pro²¹ side chains are shown. In b), the orientation of the side chains Arg⁹, Arg¹³, Ser¹⁶, and Thr¹⁷ are shown. They point towards the C-terminus with a rotation by *ca.* 60° around the N-terminal helix axis. The arrow indicates the postulated transmembrane part of the structure, its length of 40 Å corresponds to the thickness of a lipid bilayer.*

Pro²¹ does not break the helix as it is actually at the beginning of the C-terminal α -helix. The two phosphorylation sites Ser¹⁶ and Thr¹⁷ are located inside the angle between the two helical regions and face the C-terminal helix. After phosphorylation, the structural arrangement could change and the orientation of the N-terminal helix could differ from that of C-terminal helix as a result of the insertion of the charged phosphate group at Ser¹⁶ and/or Thr¹⁷.

Structure of Phospholamban and its Biochemical Implications. The three-dimensional structure of [⁴¹F]PLN described here has been obtained for the monomeric form of PLN, which retains full biological activity [11]. The question of whether the active form of PLN in the membrane is a pentamer or a monomer is still controversial. However, recent observations indicate that the form that binds to and inhibits the SERCA pump in the membrane is the monomer rather than the pentamer [22]. This prompted our decision to solve the three-dimensional structure of PLN in its monomeric form to obtain information on its biological function.

Mutagenesis experiments in different laboratories have provided detailed information on the domains of PLN and the SERCA pump involved in the interaction of the two proteins. Recently, *MacLennan* and co-workers [8] have shown that replacing the hydrophobic residues on one face of the transmembrane helix of PLN with alanines reduced the ability of PLN to interact with the pump. Later on, the same group [9] has provided evidence that all SERCA pump residues essential for the interaction are located on one face of its transmembrane helix 6 (M6).

The cross-linking experiments by *James et al.* [6] have suggested an electrostatic interaction between charged residues in the cytosolic domain of PLN and polar residues of the SERCA pump, downstream of Asp³⁵¹. Later experiments by *MacLennan* and co-workers [7] have shown that charged residues in a loop region between Asp³⁵¹ and the ATP-binding domain (*i.e.*, ³⁹⁷DDKPV⁴⁰²) of the pump, were critical for its functional interaction with the N-terminal portion of PLN [7]. This was corroborated by the finding by *Hughes et al.* [23] that the positively charged arginines of the N-terminal part of PLN (especially Arg⁹ and Arg¹³) were involved in the association with the SERCA pump: in the structure presented here, Arg⁹ and Arg¹³ lie on the same site of the N-terminal helix as Thr¹⁷. This was also observed by *Pollesello et al.* [12] on a fragment of PLN (residues 1–36) in a H₂O/CF₃CH₂OH mixture. It appears from the biochemical studies that, to interact with the critical loop region of the SERCA pump, PLN may have to assume a more extended conformation with the helical axes oriented almost parallel to each other. Such a reorientation of the two helices appears possible: When the backbone atoms of the C-terminal helix are superimposed, the N-terminal helix is dispersed in a cone with an opening of almost 90° (*Fig. 6,b*). Thus, the potentially required flexibility of PLN around the central hinge region is indeed observed, which may be critical for the ability of the molecule to inhibit the ATPase through the interaction between essential polar residues. Clearly, it will now be important to investigate the structural consequences of the phosphorylation of Ser¹⁶ and/or Thr¹⁷ on the cytosolic region of PLN. It will also be important to perform structural studies on the interaction of PLN with peptides corresponding to the regions of the SERCA pump that are involved in the interaction with PLN. Experiments on these issues are in progress in our laboratories.

This work was supported by the *Fond der chemischen Industrie*, the *DFG*, the *MPG*, the *Graduiertenkolleg: Chemische und Biologische Synthese von Wirkstoffen* (Grk 34/3), and the *VW Foundation*, as well as the *Swiss National Science Foundation* (31-46'998.96), by the *Italian Ministry of University and Scientific Research* (MURST-PRIN, 1998), by the target protein on Biotechnology of the *National Research Council of Italy*, by the *Armenise-Harvard Foundation*, and by the *International Human Frontier Science Program Organization*. All measurements have been performed at the large-scale facility for biomolecular NMR at the University of Frankfurt (ERB CT 950034).

Experimental Part

Sample Preparation. The PLN mutant [F^{41}]PLN (C41F) was synthesized and purified as described by Vorherr *et al.* [24]. The synthesis was accomplished by double couplings and efficient capping procedures. The crude peptide was purified by HPLC ion exchange and gel-permeation chromatography ($CHCl_3/MeOH$). The NMR sample was prepared by solubilizing 6 mg of [F^{41}]PLN in $CDCl_3/CD_3OH$ 1:1 (v/v). The solvents used were CD_3OH (99.8%) and $CDCl_3$ (99.96%). After sonification and centrifugation, the soln. was transferred into a 5-mm NMR tube.

NMR Spectroscopy. All spectra were recorded at a temp. of 300 K using *Bruker-DRX600* and *-DRX800* spectrometers equipped with a Z-gradient probe. DQF-COSY [25], TOCSY [26] with mixing times of 30, 50, and 70 ms, and NOESY [27] with mixing times of 100 and 150 ms, were recorded using *States-TPPI* phase cycling [28] for quadrature detection. Relaxation delays of 1–2 s were used (for details, see Table 3). Solvent signals were suppressed with selective presaturation or by a gradient echo sequence (WATERGATE) [29]. All data were processed with UXMNMR (*Bruker Instruments*, Rheinstetten, Germany) including zero-filling and weighting the indirect dimension with a squared-sine bell function. The spectra were analyzed with FELIX, version 98 (*MSI*, San Diego, CA). Chemical shifts were reported with respect to the signal of the OH group of MeOH at 4.9 ppm.

Table 3. Acquisition and Processing Parameters for NMR Experiments

Experiment	Dimension	Acquisition points (complex)	Spectral width [Hz]	Number of scans	Matrix dimension (real points)	Spectrometer
DQF-COSY	<i>t</i> 1	768	8802	32	1024	<i>DRX 800</i>
	<i>t</i> 2	4096	8803		8192	
TOCSY (30 ms mixing time)	<i>t</i> 1	768	6601	48	1024	<i>DRX 600</i>
	<i>t</i> 2	4096	6614		4096	
TOCSY (50 ms mixing time)	<i>t</i> 1	768	6601	40	1024	<i>DRX 600</i>
	<i>t</i> 2	4096	6614		4096	
TOCSY (70 ms mixing time)	<i>t</i> 1	768	7201	48	1024	<i>DRX 600</i>
	<i>t</i> 2	4096	7184		4096	
NOESY (100 ms mixing time)	<i>t</i> 1	768	7201	32	1024	<i>DRX 600</i>
	<i>t</i> 2	4096	7184		8192	
NOESY (150 ms mixing time)	<i>t</i> 1	876	8803	32	1024	<i>DRX 800</i>
	<i>t</i> 2	4096	8803		8192	

Structure Calculations. Distance restraints were determined from the cross-peak intensity by calibration against known interproton distances of geminal protons and classified on the basis of peak intensity with upper bounds of 2.8 Å (strong), 4.0 Å (medium), and 5.0 Å (weak). A correction of 0.5 Å was added to the upper bounds of restraints involving pseudoatoms for Me, CH_2 , and aromatic groups [30]. For the lower bounds of the distance restraints, the sum of the *van der Waals* radii was used. The interresidual restraints were treated in the same way as the intraresidual ones. $^3J_{HNH\alpha}$ coupling constants were measured by the method described by *Titman* and *Keeler* [17] from the fine structure of resolved COSY cross-peaks by comparison with the in-phase *ms* of cross-peaks observed in the NOESY and calibrated by the *Karplus* equation [31]. No backbone H-bonds were included in the structure calculations.

All calculations were performed with the X-PLOR program, version 98.1, by *Brünger* [20]. The *ab initio* simulated annealing protocol started with a 32.5 ps high-temperature phase at 2000 K, followed by a first cooling phase of 25 ps, where the temperature was lowered to 1000 K in steps of 50 K. In the second cooling phase, the

temp. was lowered to 100 K, followed by a final energy minimization. A total of 644 NOE-derived distance restraints were applied with a square-well potential and a force constant of $50 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$. Restraints involving not stereospecifically assigned CH_2 protons and diastereotopic Me groups of Val and Leu were treated with the floating assignment procedure of X-PLOR. A total of five dihedral-angle restraints from $^3J(\text{HN}, \text{H}^\alpha)$ coupling constants were also applied with a force constant of $200 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{rad}^{-1}$. The final ten structures with the lowest energy were used for the structural statistics. This ensemble of ten structures satisfied the criteria of no NOE violations $> 0.30 \text{ \AA}$ and no dihedral-angle violations $> 5^\circ$. All structural representations were created with the program MOLMOL [32].

The β -turn (type III) comprising Thr¹⁷, Ile¹⁸, Glu¹⁹, and Met²⁰ was defined by the distances between the $\text{C}^\alpha(i)$ and the $\text{C}^\alpha(i+3)$, which are in a range of 5.6 \AA as described by Rose *et al.* [33]. The second evidence for a β -turn (type III) were the torsion angles $\phi(i+1) = -120^\circ$ and $\psi(i+1) = -30^\circ$ for Ile¹⁸ and $\phi(i+2) = -30^\circ$ and $\psi(i+2) = -120^\circ$ for Glu¹⁹. No H-bond could be detected between the O' of Thr¹⁷ and the H^N of Met²⁰. The coordinates of the final ten PLN (C41F) structures have been deposited with the *Brookhaven Protein Data Bank* under the PDB iD code 1FJP.

REFERENCES

- [1] P. L. Pedersen, E. Carafoli, *Trends Biochem. Science* **1987**, 12, 146.
- [2] R. W. Tsien, *Adv. Cycl. Nucl. Res.* **1977**, 8, 363.
- [3] M. Tada, M. A. Kirchberger, D. I. Repke, A. M. Katz, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 6174.
- [4] M. Tada, M. A. Kirchberger, A. M. Katz, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 2640.
- [5] C. J. Lepeuch, J. Haiech, J. G. Demaille, *Biochemistry* **1979**, 18, 5150.
- [6] P. James, M. Inui, M. Tada, M. Chiesi, E. Carafoli, *Nature (London)* **1989**, 342, 90.
- [7] T. Toyofoku, K. Kurzydowski, M. Tada, D. H. MacLennan, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 22929.
- [8] Y. Kimura, K. Kurzydowski, M. Tada, D. H. MacLennan, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 15061.
- [9] M. Asashi, Y. Kimura, K. Kurzydowski, M. Tada, D. H. MacLennan, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 32855.
- [10] J. Fuji, K. Maruyama, M. Tada, D. H. MacLennan, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 12950.
- [11] G. Chu, G. W. Dorn, W. Luo, J. M. Harrer, V. J. Kadambi, R. A. Walsh, E. G. Kranias, *Circ. Res.* **1997**, 81, 485.
- [12] P. Pollesello, A. Annala, M. Ovaska, *Biophys. J.* **1999**, 76, 1784.
- [13] B. A. Levine, V. B. Patchell, P. Sharma, Y. Gao, D. J. Bigelow, Q. Yao, S. Goh, J. Colyer, G. A. Drago, S. V. Perry, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 264, 905.
- [14] I. V. Maslennikov, A. G. Sobol, J. Anagli, P. James, T. Vorherr, A. S. Arseniev, E. Carafoli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 217, 1200.
- [15] R. Gratias, H. Kessler, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 2027.
- [16] K. Wüthrich, 'NMR of Proteins and Nucleic Acids', Wiley, New York, 1986.
- [17] J. J. Titman, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **1990**, 89, 640.
- [18] D. Wishart, B. Sykes, F. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, 222, 311.
- [19] M. Nilges, S. I. O'Donoghue, *Prog. NMR Spectrosc.* **1998**, 32, 107.
- [20] A. T. Brünger, 'X-PLOR: A System for X-Ray Crystallography and NMR', Yale University Press, New Haven, CT, 1992.
- [21] R. A. Laskowski, J. A. C. Rullmann, M. W. MacArthur, R. Kaptein, J. M. Thornton, *J. Biomol. NMR* **1996**, 8, 477.
- [22] J. M. Autry, L. R. Jones, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 15872.
- [23] G. Hughes, J. M. East, A. G. Lee, *Biochem. J.* **1994**, 303, 511.
- [24] T. Vorherr, A. Wrzosek, M. Chiesi, E. Carafoli, *Protein Science* **1993**, 2, 339.
- [25] W. P. Aue, E. Bartholdy, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229.
- [26] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 521.
- [27] A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 95, 1.
- [28] D. Marion, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1989**, 85, 393.
- [29] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 661.
- [30] C. M. Fletcher, D. N. Jones, R. Diamond, D. Neuhaus, *J. Biomol. NMR* **1996**, 8, 292.
- [31] A. Pardi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1984**, 180, 741.
- [32] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Graphics* **1996**, 14, 51.
- [33] G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 1.

Received May 18, 2000

